

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12P 21/02, 21/08, C07K 14/47, 16/18 // A61K 38/17	A1	(11) 国際公開番号 WO99/40191 (43) 国際公開日 1999年8月12日(12.08.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00545 (22) 国際出願日 1999年2月9日(09.02.99) (30) 優先権データ 特願平10/27531 1998年2月9日(09.02.98) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 清水信義(SHIMIZU, Nobuyoshi)[JP/JP] 〒285-0858 千葉県佐倉市ユーカーリが丘4-1-W2103 Chiba, (JP) 水野美邦(MIZUNO, Yoshikuni)[JP/JP] 〒114-0014 東京都北区田端6-3-20 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 小谷悦司, 外(KOTANI, Etsuji et al.) 〒550-0004 大阪府大阪市西区靱本町2丁目3番2号 住生なにわ筋本町ビル Osaka, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: DNAs OR GENES PARTICIPATING IN PARKINSON'S DISEASE (54)発明の名称 パーキンソン病に関与するDNAまたは遺伝子 (57) Abstract DNAs or genes which participate in Parkinson's disease and are useful in the diagnosis, treatment, etc. for the disease. These DNAs or genes are those comprising the full-length base sequence represented by SEQ ID NO:1 or 2, partial sequences thereof or base sequences hybridizable with the chains complementary thereto and participating in Parkinson's disease.		

(57)要約

パーキンソン病に関与し、該疾患の診断や治療等に有用なDNAまたは遺伝子を提供する。

配列表の配列番号1または2に記載の塩基配列全長、またはその部分的配列、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなり、且つパーキンソン病に関与するDNAまたは遺伝子である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MN モンゴリア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MR モーリタニア	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MW マラウイ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	MX メキシコ	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NE ニジェール	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NO ノールウェー	
CU キューバ	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PL ポーランド	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KR 韓国	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	RU ロシア	
EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン	
		SE スウェーデン	

明細書

パーキンソン病に関与するDNAまたは遺伝子

技術分野

本発明は、パーキンソン病の発病に関与する遺伝子に関するものである。パーキンソン病患者には本発明遺伝子の一部が欠失していることから、本発明遺伝子はパーキンソン病診断用遺伝子として極めて有用であり、当該遺伝子を用いて得られる蛋白質や医薬活性物質等はパーキンソン病の予防・治療にも使用できる可能性がある。

背景技術

各種慢性進行性疾患の原因となる遺伝子は一つだけではないことが多いと考えられており、これら疾患の原因遺伝子が明らかになれば、当該疾患の診断を出生前後から行うことができるのみならず、現在の技術水準からすれば遺伝子治療による上記疾患の治療も不可能ではない。

パーキンソン病も慢性疾患の一つであるが、パーキンソン病に関与する遺伝子としては1997年に報告されたアルファシヌクレインが知られているのみである。イタリア人の家系では上記遺伝子に変異し、常染色体優性のパーキンソン病が発症することがある旨報告されているが、この遺伝子を用いたとしてもパーキンソン病の診断ができるケースは非常に限られる。従ってパーキンソン病の診断に当たっては、振戦、固縮、無動、姿勢反射障害などの神経症状による臨床診断を採用しているのが現状であり、本疾患の根本的治療法はないが対症療法として、レボドーパまたはドパミン作動性化合物（作動薬）が投与されている程度にすぎない。

発明の開示

本発明は上記問題点に着目してなされたものであり、その目的は、パーキンソン病に関与し該疾患の診断や治療等に有用なDNAまたは遺伝子または遺伝子断片；組換えベクター；蛋白質またはポリペプチド；モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体；プライマーまたはプローブまたは固定化核酸またはDNAチップ；オリゴヌクレオチド等を提供することにある。

上記課題を解決することのできた本発明のDNAまたは遺伝子とは、

①配列表の配列番号1または配列番号2〔配列番号2は、配列番号1の塩基配列のうち636～719（後記するエクソン5に相当）の塩基部分を含まない、即ちオルタナティブスプライシングによるバリエーションである〕に記載の塩基配列全長、またはその部分的配列、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなり、且つパーキンソン病に関与するDNAまたは遺伝子であるところに要旨を有するものである。

更に本発明では上記①に加え、下記②～⑧の態様からなるDNAまたは遺伝子、または遺伝子断片も包含される。

②上記①に記載の塩基配列、またはそれを含有する、またはそれらを部分的に含有する塩基配列からなり、且つその遺伝的欠損がパーキンソン病の原因となるDNAまたは遺伝子、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなるDNAまたは遺伝子。

③上記①または②に記載の塩基配列であって、オルタナティブスプライシングによるバリエーションとして生じ、パーキンソン病に関与する塩基配列のDNAまたは遺伝子、またはそれら若しくはそれら

の相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなるDNAまたは遺伝子。

④上記①～③のいずれかに記載の塩基配列であり、その遺伝子産物が、配列表の配列番号1に記載の1～465のアミノ酸配列からなる蛋白質、または配列表の配列番号2に記載の1～437のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同等の機能を有する蛋白質をコードする遺伝子。

⑤上記①～④のいずれかに記載の塩基配列に対して、エクソンの欠失、ナンセンス塩基置換、ミスセンス塩基置換、塩基の欠失、塩基の付加、塩基の挿入、スプライシングの異常、フレームシフトを生じさせた遺伝子、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなり、且つ、パーキンソン病に関与するDNAまたは遺伝子。

⑥上記①～⑤のいずれかに記載のDNAまたは遺伝子の部分的塩基配列をもつDNAまたは遺伝子、または遺伝子断片、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなるDNAまたは遺伝子、または遺伝子断片。

⑦以下の(a)または(b)の蛋白質をコードする遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に記載の1～465のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) 前記アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に関与する蛋白質。

⑧以下の(c)または(d)の蛋白質をコードする遺伝子。

(c) 配列表の配列番号2に記載の1～437のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(d) 前記アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸が

欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に関与する蛋白質。

ここで、前記配列番号 1 に記載の塩基配列全長は、12 個の各エクソン間に 11 個のイントロン配列をゲノム上で介在させており、該塩基配列の内 102～1496 の部分的配列には、1～465 のアミノ酸配列をもつ蛋白質をコードするものであり、これらエクソンとイントロンの境界領域におけるイントロンの塩基配列は、下記構成よりなるものである。

エクソン 1 とエクソン 2 の間に介在するイントロンは、エクソン 1 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列を有し、エクソン 2 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 2 とエクソン 3 の間に介在するイントロンは、エクソン 2 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列を有し、エクソン 3 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 3 とエクソン 4 の間に介在するイントロンは、エクソン 3 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 7 に記載の塩基配列を有し、エクソン 4 の 5' 末端に隣接しては配列表の配列番号 8 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 4 とエクソン 5 の間に介在するイントロンは、エクソン 4 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 9 に記載の塩基配列を有し、エクソン 5 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 10 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 5 とエクソン 6 の間に介在するイントロンは、エクソン 5 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 11 に記載の塩基配列を有し、エクソン 6 の 5' 末端には配列表の配列番号 12 に記載の塩

基配列を有し、

エクソン 6 とエクソン 7 の間に介在するイントロンは、エクソン 6 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 13 に記載の塩基配列を有し、エクソン 7 の 5' 末端には配列表の配列番号 14 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 7 とエクソン 8 の間に介在するイントロンは、エクソン 7 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 15 に記載の塩基配列を有し、エクソン 8 の 5' 末端には配列表の配列番号 16 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 8 とエクソン 9 の間に介在するイントロンは、エクソン 8 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列を有し、エクソン 9 の 5' 末端には配列表の配列番号 18 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 9 とエクソン 10 の間に介在するイントロンは、エクソン 9 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 19 に記載の塩基配列を有し、エクソン 10 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 20 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 10 とエクソン 11 の間に介在するイントロンは、エクソン 10 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 21 に記載の塩基配列を有し、エクソン 11 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 22 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 11 とエクソン 12 の間に介在するイントロンは、エクソン 11 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 23 に記載の塩基配列を有し、エクソン 12 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 24 に記載の塩基配列を有する。

尚、上記①～⑧のいずれかに記載の DNA 断片または遺伝子を含む組換えベクターも本発明の範囲内に包含される。

また、上記課題を解決することのできた本発明の蛋白質とは、

(i) 配列表の配列番号 1 に記載の 1 ～ 4 6 5 のアミノ酸配列、または配列表の配列番号 2 に記載の 1 ～ 4 3 7 のアミノ酸配列からなり、且つ、パーキンソン病に関与する蛋白質、またはそれと実質的に同等の機能を有する蛋白質であるところに要旨を有するものである。

詳細には、本発明蛋白質またはポリペプチドには、下記(ii)～(viii)の態様も包含される。

(ii) 上記①～④のいずれかに記載の遺伝子から発現するパーキンソン病に関与する蛋白質、またはそれと同一または実質的に同等の機能を有する蛋白質。

(iii) 上記⑤に記載の遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列からなり、且つ、パーキンソン病に関与する蛋白質、またはそれと同一または実質的に同等の機能を有する蛋白質。

(iv) 上記(iii) に記載のアミノ酸配列のうち、1カ所以上でアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、パーキンソン病に関与する蛋白質。

(v) 上記(ii)～(iv)のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の内 1 ～ 7 2 のユビキチン様部分的アミノ酸配列を含有し、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の内 4 1 8 ～ 4 4 9 のジンクフィンガー蛋白質様部分的アミノ酸配列を含有する蛋白質。

(vi) 以下の (a) または (b) の蛋白質。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の 1 ～ 4 6 5 のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に関与する蛋白質。

(vii) 以下の (c) または (d) の蛋白質。

(c) 配列表の配列番号 2 に記載の 1 ~ 4 3 7 のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(d) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に關与する蛋白質。

(viii) 上記請求項 (i) ~ (vii) のいずれかに記載のアミノ酸配列の部分断片からなる、または該部分断片を含有する、または該アミノ酸配列の全長を含有するポリペプチドまたは蛋白質。

尚、上記 (i) ~ (viii) のいずれかに記載の蛋白質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体も本発明の範囲内に包含される。

また、本発明のプライマーまたはプローブまたは固定化核酸または DNA チップは下記 (I) ~ (IV) の用途に好適に使用される。

(I) 上記 ① ~ ⑧ のいずれかに記載の DNA または遺伝子の塩基配列、遺伝的変異、欠損、発現量を調べることに用いるか、或いはそれらの濃縮に用いるか、

(II) 上記 ① ~ ⑧ のいずれかに記載の DNA または遺伝子のいずれかに記載の DNA 又は遺伝子から転写、プロセシングされる RNA の塩基配列、遺伝的変異、欠損、発現量を調べることに用いるか、或いはそれらの濃縮に用いるか、

(III) 配列表の配列番号 1 または配列番号 2 に記載の各エクソン配列の塩基配列、遺伝的変異、欠損を調べることに用いるか、或いはその遺伝子座のハプロタイピングに用いるか、

(IV) 前述の各イントロン配列の塩基配列、遺伝的変異、欠損を調べることに用いるか、或いはその遺伝子座のハプロタイピングに用いるか、

具体的には、下記(1)～(14)に示す14種類のプライマーまたはプローブのセットを少なくとも1個、使用することができる。

(1) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン1と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号25に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号26に記載の塩基配列を有する。

(2) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン2と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号27に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号28に記載の塩基配列を有する。

(3) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン3と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号29に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号30に記載の塩基配列を有する。

(4) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン4の塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列

番号 3 1 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 2 に記載の塩基配列を有する。

(5) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 4 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 3 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 4 に記載の塩基配列を有する。

(6) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 5 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 5 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 6 に記載の塩基配列を有する。

(7) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 6 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 7 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 3 8 に記載の塩基配列を有する。

(8) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 7 の塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 39 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 40 に記載の塩基配列を有する。

(9) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 7 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 41 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 42 に記載の塩基配列を有する。

(10) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 8 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 43 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 44 に記載の塩基配列を有する。

(11) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 9 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 45 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 46 に記載の塩基配列を有する。

(12) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 10 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、

下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 47 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 48 に記載の塩基配列を有する。

(13) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 11 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 49 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 50 に記載の塩基配列を有する。

(14) 上記①に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 12 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べる為の、下記塩基配列を有するプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 51 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 52 に記載の塩基配列を有する。

更に本発明には、下記(a) ~ (c) のオリゴヌクレオチドまたオリゴヌクレオチド類似体またはそれらの修飾物も包含される。

(a) 上記①~⑧のいずれかに記載の塩基配列の部分的配列からなるか、或いは上記①~⑧のいずれかに記載の塩基配列にハイブリダイズするもの。

(b) ヒト RNA を鋳型とした PCR 法、ヒト cDNA を鋳型とした PCR 法、または RT-PCR 法のいずれかの方法により、上記①~⑧のいずれかに記載の全塩基配列または部分的塩基配列を増幅

する、或いは上記①～⑧のいずれかに記載の全塩基配列または部分的塩基配列を部分的に含有して増幅するためのもの。

(c) 配列表の番号 1 または 2 に記載のエクソンと、それらに隣接する前述のイントロンを含有する塩基配列を P C R 法により増幅する、或いはその塩基配列の一部を P C R 法により増幅するためのオリゴヌクレオチド。

図面の簡単な説明

第 1 図は、実施例 1 に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第 2 図は、第 1 図のパーキンソン病患者を用い、P C R 法によるハプロタイピングを行った結果を示す図。

第 3 図は、第 1 図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第 4 図は、実施例 3 で得られた、6 個の c D N A 断片と 1 個の完全長遺伝子の構成を示す図。

第 5 図は、本発明遺伝子の N 末端部分のアミノ酸配列とユビキチンとの相同性を示す図。

第 6 図は、第 1 図のパーキンソン病患者及びその家族におけるゲノム D N A 断片の E c o R I 消化物をゲル電気泳動した結果を示す図。

第 7 図は、実施例 7 に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第 8 図は、第 7 図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第 9 図は、実施例 7 で得られた、第 7 図のパーキンソン病患者の c D N A 断片を示す図。

第10図は、ヒトの各種組織中に発現される本発明遺伝子のmRNAを示す図。

第11図は、ヒトの各種組織中に発現される本発明遺伝子のmRNAを示す図。

第12図は、実施例9に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第13図は、第12図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第14図は、第12図のパーキンソン病患者及びその家族におけるゲノムDNA断片のEcoRI消化物をゲル電気泳動した結果を示す図。

第15図は、実施例10に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第16図は、第15図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第17図は、実施例11に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第18図は、第17図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第19図は、実施例12に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第20図は、第19図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第21図は、実施例13に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第22図は、第21図のパーキンソン病患者及びその家族における遺伝子欠失の有無を示す図。

第 2 3 図は、実施例 1 4 に用いたパーキンソン病患者の家系図を示す説明図。

第 2 4 図は、野生型対立遺伝子及び変異型対立遺伝子のエクソン 5 からの P C R 産物の直接配列を示すクロマトグラム。

第 2 5 図は、野生型 (W) パーキン遺伝子の D N A 配列及びアミノ酸配列、並びに 1 塩基欠失を有する変異型 (M) パーキン分子の予想される配列を示す図。

第 2 6 図は、実施例 1 4 の P C R 産物の N 1 a I V 制限部位分析の結果を示す図。

第 2 7 図は、脳切片中に発現される本発明遺伝子の免疫組織化学染色の結果を示す顕微鏡写真。

第 2 8 図は、脳切片中に発現される本発明遺伝子、ポリユビキチン、及び α シヌクレインの免疫染色の結果を示す顕微鏡写真。

第 2 9 図は、健常人、P D 患者及び A R - J P 患者の前頭皮質小葉全ホモジネートをイムノブロットした結果を示す図。

第 3 0 図は、健常人の前頭皮質小葉亜細胞分画をイムノブロットした結果を示す図。

第 3 1 図は、健常人、P D 患者及び A R - J P 患者の S N、被殻及び前頭皮質小葉をイムノブロットした結果を示す図。

第 3 2 図は、エクソン 4 及び 1 0 からの P C R 産物をゲル電気泳動した結果を示す図。

第 3 3 図は、本発明蛋白質のアミノ酸配列を Hydropathy plot したグラフ。

第 3 4 図は、3 6 6 位の A r g が T r p へ置換するのに伴い、 α ヘリックス部分が β シート構造に変化する様子を説明する図。

発明を実施する為の最良の形態

パーキンソン病或いはパーキンソン症候群は、遺伝的要因及び環境要因等が関与して発症すると考えられており、個々の要因を解き明かしていくことは、同病、同症候群発症機序の根本的な解明及び治療にとって急務である。本発明者らは、パーキンソン病の発症に関与する遺伝子を見出すべく鋭意検討してきた。その結果、パーキンソン病の一つである若年性パーキンソン病は、6番染色体のq 2 5 . 2 - q 2 7 の領域、詳細には染色体マーカーD S 4 3 7 とD 6 S 2 6 4 の間の1 7 c M の領域と密接に関連することが分かった (Matsumine et al., Am. J. Hum. Genet. 60(1997)588-596)。そこで若年性パーキンソン病を発症した患者を用い、後記する実施例に基づいて本疾患に関与する遺伝子を特定し、本発明を完成したのである。

以下、本発明遺伝子を見出すに至った実験経緯に沿って本発明を詳述する。ただし、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲で変更実施することは全て本発明の技術範囲に包含される。

実施例 1 : 若年性パーキンソン病患者における染色体欠失領域

本実施例に用いたパーキンソン病患者の家系図を第 1 図に示す。図中、□は男性、○は女性、●は女性患者を夫々意味し、各記号に斜線の引いた者は既に死亡していることを意味する。該患者の両親及び兄弟はいずれも健常人であったが、患者は十代にパーキンソン様症状を呈して本疾患と診断され、その後も症状は徐々に進行し、現在に至っている。

第 1 図中*の付した被験者（患者及び健常人 2 名）のゲノム DNA に対し、6 番染色体マーカーの一つである D 6 S 3 0 5 を用いた PCR 法によるハプロタイピングを行った。その結果を第 2 図に示す。

第2図より、D 6 S 3 0 5 は患者の両親及び兄弟の D N A テンプレートから増幅されたが、患者 D N A テンプレートからは増幅されなかった。従ってこの患者は、染色体マーカーの一つである D 6 S 3 0 5 が欠失していることが判明した。

実施例 2 : D 6 S 3 0 5 を含むゲノム断片のスクリーニングと
エクソントラッピング

実施例 1 より、本患者にはマーカー D 6 S 3 0 5 に対応するゲノム D N A が欠失していることから、この領域には、本疾患に関連する遺伝子が存在する可能性がある。そこで、D 6 S 3 0 5 の一部の塩基配列を有するアンプリイマーを用いて、9 6 , 0 0 0 種のゲノム断片からなる正常ヒトゲノムライブラリー (Keio ヒト BAC ライブラリー) の P C R 法によるスクリーニングを行った。その結果、約 1 1 0 k b の大きさからなるゲノム断片 K B 7 6 1 D 4 と K B 4 3 0 C 4 の二つのクローンが得られた。

次に、これらのゲノム断片中に存在する遺伝子のエクソン断片を単離するためにエクソントラッピングを行った。エクソントラッピングは、エクソントラッピングシステム (GIBCO / BRL) を用い、附属の操作マニュアルに従って行った。その結果、上記二つのゲノム断片は約 1 1 0 k b と非常に大きかったにも拘わらず、単離されたエクソンは J - 1 7 だけであった。

次いで、このエクソン J - 1 7 の塩基配列に基づき、このエクソン J - 1 7 自身を増幅するための P C R プライマー (J - 1 7 Inner) 及び B A C K B 7 6 1 D 4 をテンプレートにしてエクソン J - 1 7 に隣接するイントロンの塩基配列を決定し、その配列を基に J - 1 7 を含む断片を増幅するための P C R プライマー (J - 1 7 Outer) の 2 種類のプライマーセットを作製し、実施例 1 に供した被験者 (患者、健常な両親及び兄弟) のゲノム D N A の P C R

増幅を行った。その結果を第3図に示す。尚、同図には本実施例及び後記する実施例6の結果も併記している。

第3図に示す様に、父（レーン1）、母（レーン2）及び兄弟（レーン4）の健常人ゲノムDNAからはPCR産物が見出されたのに対し、本患者DNA（レーン3）からは全く見出されなかった。従って、本患者では少なくとも本遺伝子のエクソンJ-17に相当する染色体部分が欠失していることが分かった。

実施例3：正常ヒトcDNAライブラリーからの本遺伝子のスクリーニング

次に、このJ-17を含む遺伝子全長、合わせて翻訳配列全長をカバーするcDNA群を単離するため、cDNAライブラリーから本遺伝子をスクリーニングを行った。具体的には、正常ヒト胎児の脳及び骨格筋のcDNAライブラリーをクローンテック社より購入し、プローブとしては、実施例2で得られた本遺伝子のエクソンの一部であるJ-17断片を第1のプローブとして用いると共に、更にこのプローブを用いた第1次スクリーニングで得られた陽性クローンのインサートDNA断片を第2次スクリーニング用プローブとして用いた。その結果、第4図に示す7個のcDNA [HFB1, 3, 4, 5及びSKM1, 3, 8] が得られた。陽性クローンのインサートDNA断片は、ベクター特異的プライマー2種（F10 inner : 5'-AGCCTGGTTAAGTCCAAGCTG-3' 及び R10 inner : 5'-GAAGGTCCCATTTTTCGTTTTTC-3'）を用いて増幅した。

この様にして増幅された陽性DNA断片について、プライマーウォーキング法により直接塩基配列の決定を行った。サイクル配列の決定に当たっては、これらプライマーと市販のキット [ABI PRISM labeling kits (Perkin-Elmer 社)] を用い、操作マニュアルに準じて Applied Biosystems 製「ABIモデル377 DNA シーク

エンサー」により行った。

その結果、7個のcDNAは第4図に示した重なり関係になっていた。これらのうち最長のSKM8は2960塩基からなり、その塩基配列中に1395塩基(nt102～nt1496；終止コドンを含めるとnt1499まで)で465個のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする翻訳配列全長を含んでいた。

また、上記cDNA断片のうち4個(HFB3, 4及びSKM1, 3)については、nt636～719の84塩基(bp)が欠失していた。このことは、ゲノムの本遺伝子から成熟したmRNAがスプライシングを受けて生成する際にその切れ方が少なくとも二通りあることを示している。

尚、本遺伝子によってコードされる上記1～465個のアミノ酸配列からなる蛋白質のうち、N末端近傍(1番のメチオニンから72番のアルギニンまで)では、第5図に示す通りユビキチンと中程度の相同性が見られた(同一アミノ酸33%)。

このユビキチンは細胞内で不要になった蛋白質を除去するのに重要な物質として知られ、各種神経変性疾患への関与も指摘されている。例えばアルツハイマー病におけるpaired helical filaments (PHFs)や、パーキンソン病におけるLewy bodiesなどは、抗ポリユビキチン抗体で染まることが知られている。そのメカニズムは、まずユビキチンが各種蛋白質に結合し、ユビキチン同士が結合を繰り返してマルチユビキチン鎖を形成し、プロテアソーム系に分解を誘導して代謝されると考えられている。

このユビキチン同士の結合には48番目のリジン残基が必須であるとされており、上記蛋白質においても48番目にリジンが存在すると共に、その前後(例えば44～48番、及び51番)のアミノ酸配列も一致することから、上記蛋白質はユビキチン様の機能を持

つ可能性が示唆される。更に近年、N末端部にユビキチン様部分を含んだ、融合蛋白がいくつか発見されており、この場合、ユビキチン部分は分子シャペロンとしての働きが示唆されている。

この様に本蛋白質のN末端付近ではユビキチンとの相同性が観察されるが、73番目以降のアミノ酸配列においてはユビキチンとの相同性はほとんど見られない。一方、C末端付近(418~449番)では、システイン残基が非常に多い特定のアミノ酸配列：

Cys-X₂-Cys-X₉-Cys-X₁-His-X₂-Cys-X₄-Cys-X₄-Cys-X₂-Cysを有しており、この配列は、ジンクフィンガー蛋白質(亜鉛と結合し細胞の成長・分化及び発生に深く関与している蛋白質)の亜鉛結合部分の配列の一種であるリングフィンガーモチーフ(Cys-X₂-Cys-X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-His-X₍₂₋₃₎-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys)と極めて類似している。従って、本発明蛋白質は、新規なジンクフィンガー蛋白質の一種であると推定される。

実施例4：ゲノムライブラリーからの本ゲノム遺伝子のスクリーニング

前記実施例2で得られた二つの陽性ゲノムクローン(KB761D4及びKB430C4)にはエクソン(J-17)以外は含まれていなかったため、その他のエクソン配列を含むゲノム断片を得るため、本実施例では、前記cDNAライブラリーの陽性クローンのうち最もサイズの大きいSKM8をプローブとして、95,232クローンからなるゲノムライブラリー(KeioヒトBACライブラリー)からハイブリダイゼーションによるBACクローンのスクリーニングを行った。その結果、新たに24個の陽性クローンが得られた。

また、cDNAの塩基配列のN末端部分はエクソン1に相当するが、エクソン1を増幅するPCRプライマーを作製し、PCR法によるBACライブラリーのスクリーニングを行い、更にもう一つの陽性クローンを得た。

この様にして得られた合計25個のクローンを用いて、プライマーウォーキング法(BEE法)により各エクソンの同定及び各エクソンに隣接するイントロン配列の決定を行った。その結果、エクソン1～3, 5, 6, 8～12はこれらの25個のBACクロンのいずれかにマップされた。またJ-17はエクソン7に相当していた。しかし、エクソン4を含むゲノム配列をもつBACクローンはこれらの25個のBACクローン中には含まれていなかった。

そこで更に、エクソン4を増幅するPCRプライマーを作製し、Genome Systems Inc.の有するゲノムライブラリーのPCRスクリーニングを行うことにより新たに2つの陽性クローンを得た。前述のプライマーウォーキング法により、27クロンのBAC-DNAをテンプレートにして、各エクソンとその隣接イントロンの塩基配列を決定した。プライマーウォーキング法に用いたプライマーは、cDNA配列に基づいて適当に合成した。各プライマーに対応するBACクローンは、プライマーそのものをプローブとしたオリゴヌクレオチドコロニーハイブリダイゼーション法により仕分けした。シーケンシングにはDNAシーケンサーを用いた。

その結果、この新規遺伝子のエクソンとイントロンの構成が明らかになり、本発明の遺伝子はゲノム上で全長500kb以上の非常に大きな遺伝子であり、12のエクソンとその間にある非常に大きな11のイントロンから構成されていることが明らかになった。これらエクソンとイントロンの境界領域におけるイントロンの塩基配列は前述した通りであるが、表1に、エクソンとイントロンの境界

領域における塩基配列をまとめて示す。

表 1

Intron - exon boundaries of Parkin gene					
Exon		Intron		Exon	
Exon 1	ACCATGATAG	gtacgtgggt.....ccttggtcag	TGTTTGTCAG	Exon 2	
Exon 2	GACTGTGCAG	gtgagtcctcc.....tcccaaacag	AATTGTGACC	Exon 3	
Exon 3	GGAAGTCCAG	gtaattggaa.....tcttctccag	CAGGTAGATC	Exon 4	
Exon 4	CTTGACCCAG	gtaaggaaat.....tttcccaaaag	GGTCCATCTT	Exon 5	
Exon 5	GACTAGTGCA	gtaagtacct.....tttcttttcag	GAATTTTCTT	Exon 6	
Exon 6	CAGACGTCAG	gtaaggatct.....ctctctgcag	GAGCCCGTC	Exon 7	
Exon 7	CCTGTGTGG	gtaagtcctag.....tttcccaaacag	CTGGCTGTCC	Exon 8	
Exon 8	AGAAGAGCAG	gtgagtgagc.....ggtttttgcag	TACAACCGGT	Exon 9	
Exon 9	GGCTGTGGG	gtgagtactg.....tctttttgcag	TTTGCCCTCT	Exon 10	
Exon 10	AAC TACTCAG	gtacagaatg.....gtttccccag	GCCTACAGAG	Exon 11	
Exon 11	GAAAAAATG	gtgagtcctgt.....cccccaaacag	GAGGCTGCAT	Exon 12	

実施例 5 : ゲノム DNA エクソン部分の塩基配列の確認

次に、実施例 4 で明らかになったエクソン部分の塩基配列を増幅して cDNA の対応部分と一致するかどうかを確認する為に、各エクソンの 5' 側と 3' 側近傍のイントロンの塩基配列に基づく（一部のプライマーはエクソンの部分配列に基づく）プライマーセット 14 組を合成し、正常ヒト末梢血の白血球を用いて常法により調整した DNA をテンプレートにして PCR を行った。参考の為に、本実施例に用いたプライマーセット 14 組の塩基配列を表 2 に記載する。

表 2

Primer sequences and sizes of expected PCR products

Exon	primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	product size(bp)
1	Ex 1	GCGCGGCTGGCGCGCTGCGGCA	GCGCGCAGAGAGGCTGTAC	112
2	Ex 2	ATGTGCTATCACCATTAAAGGG	AGATTGGCAGCGCAGCGGCATG	308
3	Ex 3	ACATGTCACCTTTTGCTTCCCT	AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC	427
4	Ex 4 Inner	AGGTAGATCAATCTACAACAGCT	CTGGGTCAAGGTGAGCGTTGCCTGC	121
5	Ex 4 outer	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	AGGCAATGTGTTAGTACACA	261
6	Ex 5	ACATGTCCTTAAGGAGTACATTT	TCTCTAATTCCTGGCAACAGTG	227
7	Ex 6	AGAGATTGTTTACTGTGGAACA	GAGTATGCTATTTTATAGATCCT	268
8	J-17 Inner	GAGCCCGTCTCCTGGTTTCC	CCACACAAGGCGAGGAGTAGCCAA	137
9	J-17 outer	TGCCTTTCCACACTGACAGGTACT	TCTGTTCTTCATTAGCATTAGAGA	239
10	Ex 8	TGATAGTCATAACTGTGTGAAG	ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT	206
11	Ex 9	GGGTGAAATTTGCAGTCAGT	AATATAATCCCAGCCCCATGTGCA	278
12	Ex 10	ATTGCCAAATGCAACCTAATGTC	TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT	165
13	Ex 11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	CAACACACCCAGGCACCTTCAGA	303
14	Ex 12	GTTTGGGAATGCGTGTTTT	AGAATTAGAAAATGAAGGTAGACA	255

上記PCR法は以下の様にして行った。各反応液（10ml）中に、100ngのDNA、1×PCR緩衝液[50mMのTris-HCl（pH9.2，25℃），14mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1.75mMの MgCl_2]，各350 μM のdNTP，各0.5 μM のプライマー及び0.35単位のExpand Long Taqポリメラーゼ（Boehringer Mannheim 社）を含有し、PCR条件：94℃で30秒，50～53℃で30秒，68℃で30秒～1分を1サイクルとして合計35サイクル実施した。

この様にして増幅された各DNA断片の塩基配列を、適切なプライマーと市販のキットを用いて決定した。その結果を表2に併記する。

表2に示す通り、上記プライマーを用いたPCR法により得られたものは、いずれもcDNAより得られた塩基配列の対応部分と一致することが分かった。

実施例6：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失（その1）

次いで、実施例1における若年性パーキンソン病患者及びその家族において、本発明遺伝子に異常があるかどうかを検討した。

詳細には、これら被験者の白血球よりゲノムDNAを調製して鋳型として用いると共に、表2のプライマーセットのうちエクソン2，3，J-17インナー，J-17アウター及びエクソン8の5'側と3'側のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。その結果を第3図に示す。

第3図より、パーキンソン患者の父親（レーン1）、母親（レーン2）及び兄弟（レーン4）のゲノムDNAを鋳型とした場合は、各エクソンに相当する配列が増幅されており、これらのDNAには欠失若しくは大きな変異はないことが分かる。これに対してパーキ

ンソン病患者のDNAを鋳型とした場合（レーン3）は、エクソン3，4，5，6，7に相当する部分の塩基配列の増幅は全く見られなかった。従って本患者のゲノム遺伝子は、エクソン3～7に相当する長い塩基配列が欠失していることが明らかになった。

更に、上記被験者のゲノムDNAを制限酵素EcoRIで消化した後、電気泳動で分離し、ナイロンメンブレン上にサザンブロットを行い、放射性PでラベルしたcDNAプローブSKM8を用いてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、第6図に示す通り、患者の両親及び兄弟では、少なくとも8個のEcoRI断片が見出されたのに対し、患者には4個の断片しか見出されなかった（図中、*は検出されなかった4個のEcoRI断片を示す）。従って、この結果からも患者のゲノム遺伝子は、特定部分が欠失若しくは変異していることを確認できる。

実施例7：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失（その2）

実施例6より、若年性パーキンソン病患者には本発明遺伝子が欠失等していることが明らかになった。従って本発明遺伝子の欠失等は若年性パーキンソン病を誘発することが極めて強く示唆されたが、この点を確定する為に、別の患者を用いて同様に実験した。

詳細には、第7図に示す家系図を有する若年性パーキンソン病患者の家族のゲノム解析を行った。尚、6人の兄弟姉妹のうち2人の兄弟は健常であったが、その他の4人の兄弟姉妹はいずれも若年性パーキンソン病患者であった。図中、*を付した者（即ち、母親と2人の健常な兄弟及び本疾患を有する2人の姉妹）のゲノムDNAを鋳型とし、実施例5と同様の方法により、各エクソンに相当するプライマーを用いてPCRを行った。その結果を第8図に示す。

第8図より、本実施例に用いた2人の患者のゲノムDNA（レー

ン 2 及び 3) ではエクソン 4 が欠失しているのに対し、健常人である母親 (レーン 1) 及び 2 人の姉妹の D N A (レーン 5 及び 6) には欠失は見られなかった。

更に、このうちの一人の患者の脳組織より、標準 A G P C 法を用いて m R N A を抽出し、全量 1 m g の m R N A を Titan T M one tube RT-PCR System kit (Boehringer Mannheim 社製) に 5 0 ° C で 3 0 分間プライムした後、反応液をそのまま用いて順方向のプライマー (配列表 1 の n t 3 5 1 ~ n t 3 7 1) 5 ' - G G A G G C G A C G A C C C C A G A A A C - 3 ' 及び逆方向のプライマー (配列表 1 の n t 9 6 3 ~ n t 9 8 3) 5 ' - G G G A C A G C C A G C C A C A C A A G G - 3 ' と共に P C R を行った。P C R 条件は 9 4 ° C で 3 0 秒、次いで 5 6 ° C で 3 0 秒、更に 6 8 ° C で 1 分というサイクルを合計 4 5 回実施した。この様にして得られた P C R 産物につき、c D N A 塩基配列を解析した結果を第 9 図に示す。

第 9 図より、この患者の m R N A ではエクソン 4 が完全に欠失し、エクソン 3 とエクソン 5 が直接結合していることが明らかになった。従って、独立 2 家系の若年性パーキンソン病患者において、本発明遺伝子の欠失が確認され、本発明遺伝子の欠失が若年性パーキンソン病を誘発することが明らかになった。

実施例 8 : 各種組織における本遺伝子 m R N A の発現

本発明遺伝子の m R N A [P o l y (A) +] がヒトの各組織中にどの程度発現しているかを調べる為、ゲノム断片 J - 1 7 を用いたノザンブロット分析を行った。

詳細には、多組織のノザンブロットをクローンテック社より購入すると共に、プローブとして本発明遺伝子のエクソン 4 に相当する J - 1 7 を用い、操作マニュアルに準じてノザンブロッティングを行った。その結果を第 1 0 図及び第 1 1 図に示す。尚、第 1 0 図中

((a))に示す組織は、左から順に脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血白血球；同図(b)に示す組織は、左から順に心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓；同図(c)に示す組織は、左から順に胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎、骨髄の意味である。また、第11図中(a)に示す組織は、左から順に小脳、大脳皮質、延髄、脊髄、後頭極、前頭葉、側頭葉、被殻；同図(b)に示す組織は、左から順に扁桃体、尾状核、脳梁、海馬、全脳、黒質、視床下核、視床の意味である。

第10図、第11図の結果より、本実施例で検討した全ての組織中に、ポリAテールを含む4.5kbのmRNAが検出されたが、特に脳、心臓、精巣および骨格筋には豊富に発現していた。このうち脳内領域における発現はいずれのセクションでも認めるが、大脳皮質や前頭葉には一層多く発現していることが分かった。

実施例9：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失(その3)

本実施例に用いたパーキンソン病患者の家系図を第12図に示す。図中、1～7の番号を付した者(即ち、両親と3人の健常な姉妹、及び本疾患を有する2人の兄弟)の白血球よりゲノムDNAを調整して鋳型として用いると共に、表3に示すオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてPCR増幅を行った。

表 3

Primer sequences and sizes of PCR products

Exon	primer	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')	product size(bp)
1	Ex 1	GCGGGCTGGCGCCGCTGCGGCA	GCGCGCAGAGAGGCTGTAC	112
2	Ex 2	ATGTTGCTATCACCATTTAAGGG	AGATTGGCAGCGCAGCGGCATG	308
3	Ex 3	ACATGTCACCTTTTGCTTCCCT	AGCCCATGCTCCATGCAGACTGC	427
4	Ex 4	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	AGGCAATGTGTTAGTACACA	261
5	Ex 5	ACATGTCCTTAAGGAGTACATT	TCTCTAATTTCTCGCAACACAGTG	227
6	Ex 6	AGAGATTGTTTACTGTGGAACA	GAGTGATGCTATTTTAGATCCT	268
7	Ex 7	TGCCTTTCCACACTGACAGGTACT	TCTGTTCTTCATTAGCATTAGAGA	239
8	Ex 8	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG	ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT	206
9	Ex 9	GGTGAAATTTGCAGTCAGT	AATATAATCCCAGCCCATGTGCA	278
10	Ex10	ATTGCCAAATGCAACCTWTGTC	TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT	165
11	Ex11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	CAACACACCAGGCACCTTCAGA	303
12	Ex12	GTTTGGGAATGCGGTGTTT	AGAAATTAGAAAATGAAGGTAGACA	255

すべての反応は以下の様にして行った。25 μ l 反応混合物中には、50 mMのKCl, 10 mMのTris (pH 8.3), 1.5 mMのMgCl₂, 0.02%のゼラチンを、プライマー類, 10 nmolの各dNTP, 及び2.5単位のAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) と共に含有しており、PCR条件: 94°Cで10分間の最初の変性に引続き、94°Cで30秒間、55°Cで30秒間、72°Cで45秒間を1サイクルとして合計40サイクル行い、次いで72°Cで10分間の最終のエクステンションを行った。この様にして得られたPCR産物を、臭化エチジウムで染色した2%アガロースゲルで可視化し、標的エクソンの有無を調べた。その結果を第13図に示す。

同図に示す様に、パーキンソン病の2人の患者のDNAを鋳型とした場合(レーン6, 7)には、エクソン5に相当する部分の塩基配列の増幅は全く見られなかった。

更に上記被験者のうちパーキンソン病患者(第12図中の6に相当する)及びその父親のゲノムDNAを制限酵素EcoRIで消化した後、電気泳動で分離し、ナイロンメンブレン上にサザンブロットを行い、放射性PでラベルしたDNAプローブSKM8を用いてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、第14図に示す通り、患者の父親では少なくとも8個のEcoRI断片が見出されたのに対し、患者には7個の断片しか見出されなかった(図中、*は検出されなかった1個のEcoRI断片を示す)。従って、この結果からも患者のゲノム遺伝子は、特定部分が欠失若しくは変異していることを確認できる。

実施例10: 若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失(その4)

実施例 9 とは異なる別の患者を用いて同様に実験を行った。詳細には、第 15 図に示す家系図を有する若年性パーキンソン病患者の家族のゲノム解析を行った。尚、7 人の姉妹のうち 4 人の姉妹は健常であったが、その他の 3 人の姉妹は、いずれも若年性パーキンソン病患者であった。図中、1～6 の番号を付した者のゲノム DNA を鋳型とし、実施例 9 と同様の方法により、各エクソンに相当するプライマーを用いて PCR を行った。その結果を第 16 図に示す。

同図に示す様に、パーキンソン病患者の DNA を鋳型とした場合（レーン 3，6）には、エクソン 3 に相当する部分の塩基配列の増幅は全く見られなかった。

実施例 11：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失（その 5）

更に別の患者を用いて実施例 9 と同様に実験を行った。詳細には、第 17 図に示す家系図を有する若年性パーキンソン病患者の家族のゲノム解析を行った。尚、5 人の兄弟姉妹のうち 3 人の兄弟姉妹は健常であったが、その他の 2 人の兄弟姉妹は、いずれも若年性パーキンソン病患者であった。図中、1～3 の番号を付した者のゲノム DNA を鋳型とし、実施例 9 と同様の方法により、各エクソンに相当するプライマーを用いて PCR を行った。その結果を第 18 図に示す。

同図に示す様に、パーキンソン病患者の DNA を鋳型とした場合（レーン 1）には、エクソン 4 に相当する部分の塩基配列の増幅は全く見られなかった。

実施例 12：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失（その 6）

更に別の患者を用いて実施例 9 と同様に実験を行った。詳細には、第 19 図に示す家系図を有する若年性パーキンソン病患者の家族の

ゲノム解析を行った。尚、患者の両親はいずれも健常人であり、8人の兄弟姉妹のうち6人の兄弟姉妹は健常であったが、その他の2人の兄弟姉妹は、いずれも若年性パーキンソン病患者であった。図中、1～8の番号を付した者のゲノムDNAを鋳型とし、実施例9と同様の方法により、各エクソンに相当するプライマーを用いてPCRを行った。その結果を第20図に示す。

同図に示す様に、パーキンソン病患者のDNAを鋳型とした場合（レーン4，8）には、エクソン3および4に相当する部分の塩基配列の増幅は全く見られなかった。

実施例13：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の部分欠失（その7）

更に別の患者を用いて実施例9と同様に実験を行った。詳細には、第21図に示す家系図を有する若年性パーキンソン病患者の家族のゲノム解析を行った。尚、患者の両親はいずれも健常人であり、5人の兄弟姉妹のうち1人の兄弟は健常であったが、その他の4人の兄弟姉妹は、いずれも若年性パーキンソン病患者であった。図中、1～6の番号を付した者のゲノムDNAを鋳型とし、実施例9と同様の方法により、各エクソンに相当するプライマーを用いてPCRを行った。その結果を第22図に示す。

同図に示す様に、パーキンソン病患者のDNAを鋳型とした場合（レーン2～6）には、エクソン5に相当する部分の塩基配列の増幅は全く見られなかった。

実施例14：エクソン5の一塩基欠失ホモ接合体の同定

第23図に示す家系図等に示す家系図を有する若年性パーキンソン病患者のうち各1人につき、直接配列PCR法によって欠失、挿入または点変異をスクリーニングした。PCR法は、オリゴヌクレオチドプライマー配列に特異的であって、その5'末端に標準的な配

列プライマー (M13 universal and reverse primers) の配列を有するキメラプライマーを用いて行った。得られた P C R 産物から過剰なプライマー及び d N T P を、Ultrafree-MC centrifugal filter (Millipore) を用いて除去した後、精製した P C R 産物を Applied Biosystems 373A DNA sequencer を用いたデオキシ鎖終結法によって配列決定した。

その結果、上記被験者では、エクソン 5 の 1 塩基欠失が同定された (第 2 4 図)。第 2 4 図のうち上図 (N) は、野生型対立遺伝子のエクソン 5 の P C R 産物を直接配列決定した結果を、下図 (M) は、変異型対立遺伝子のエクソン 5 の P C R 産物を直接配列決定した結果を夫々示す。

詳細には、1 塩基欠失により 1 個のグアノシンが配列 - G G T - (コドン 1 7 9) から除去される結果、フレームシフトが起こり、アミノ酸位置 1 8 7 において停止コドンができた。ヌクレオチドおよび予想されるアミノ酸配列を第 2 5 図に示す。図中、「Normal」は野生型対立遺伝子の DNA 及びアミノ酸配列を、「Mutant」は、1 塩基欠失の見られた変異型対立遺伝子の DNA 及びアミノ酸配列を夫々示す。尚、この様な 1 塩基欠失は健常人では検出されなかった。

次に、第 2 3 図に示す家系図を有する患者 (図中 3) の 1 塩基欠失を確認すると共に、その両親及 (図中 1 及び 2) び本疾患を有していない患者の姉妹 (図中 4) の遺伝子型を確認するため、N l a I V 制限部位分析を行った。詳細には前述に記載の方法により、プライマー対を用いてエクソン 5 を増幅させた後、P C R 産物を N l a I V (New England Biolabs Inc., Massachusetts) で消化した。得られた P C R 産物を 3 % ゲル (2 % Agarose / 1 % NuSieve - Agarose を含有) で電気泳動し、臭化エチジウムで可視化した。これらの結果を第 2 6 図に示す。第 2 6 図中、レーン 1 は父親、レー

ン 2 は母親、レーン 3 は本疾患を有する姉妹の患者、レーン 4 は健常な姉妹を夫々示す。

野生型対立遺伝子はエクソン 5 では N1aIV 部位として検出可能であり、N1aIV の消化により、2 個の断片 (159 bp および 68 bp) に切断されるのに対し、1 塩基欠失による変異型対立遺伝子は 227 bp の 1 個の断片となる。この制限部位分析によれば、本実施例の患者はエクソン 5 の 1 塩基欠失による変異型ホモ接合体であるが、彼女の両親は野生型ヘテロ型接合体であり、一方、患者の健常な姉妹は野生型ホモ接合体であることが分かる。これらの結果は常染色体劣性の態様を示すものである。

実施例 15：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の
免疫組織学分析および免疫蛍光分析

本発明遺伝子（パーキンと略記する場合がある）の変異によって誘発される黒質（SN）の分子メカニズムを解明する為、本発明蛋白質に対する抗体を用い、若年性パーキンソン病（AR-JP）患者、散在性パーキンソン病（PD）患者、及び健常人の脳中における本発明蛋白質の局在化について調べた。

詳細には、15 名の PD 患者、3 名の AR-JP 患者、および 8 名の健常人について調べた。AR-JP 患者のうち、ケース 1 及び 2 は姉妹で本発明遺伝子のエクソン 4 が欠失しており、コドン 138 の後の 6 個のアミノ酸がフレームシフトして生じたストップコドンのため、142 個のアミノ酸が欠失している（truncated）。一方、ケース 3 の AR-JP 患者は 52 歳の女性患者でエクソン 3 が欠失しており、58 位のアミノ酸の後がフレームシフトして 96 位のアミノ酸で premature termination（終了）していた。

また、本実施例では、2 種類のウサギポリクローナル抗体（M-73 及び M-74）、アルファシヌクレインに対するウサギポリク

ローナル抗体、ポリユビキチンに対するマウスモノクローナル抗体を夫々用いた。

まず、免疫組織学染色を以下の要領で実施した。ホルマリン固定パラフィンで包埋した上記被験者の中脳、前頭皮質小葉、及び被殻の各切片を、3'-3'-ジアミノベンジジンを用いたアビジン-ビオチン複合体標準法によって適切に希釈して可視化した後、抗パーキン抗体M-74、抗アルファシヌクレイン抗体、または抗ポリユビキチン抗体で処理した。また、二重免疫蛍光法は、ウサギ抗パーキン抗体M-74およびマウス抗ポリユビキチンモノクローナル抗体を用い、FITC結合ヤギ抗ウサギIgG (Dako, Carpinteria, CA)、ビオチニル化したヤギ抗マウスIgG (Sigma, St Louis Mo)、およびアビジン-ローダミン (sigma) と共にインキュベーションし、蛍光性焦点 (confocal) 顕微鏡MRC-1024 (Bio-Rad, Richmond, CA) で観察して実施した。これらの結果を第27図及び第28図に示す。

このうち第27図は、抗パーキン抗体M-74を用い、脳切片中の本発明遺伝子を免疫組織化学染色した顕微鏡写真であり、図中A~CはPD患者 (ケース2) ; D~Fは健常人 (ケース1) ; G~IはAR-JP患者 (ケース1) の結果を夫々示す。また、A, D, GはSN中のメラニン含有ニューロン ; B, E, Hは被殻 ; C, F, Iは前頭皮質小葉の顕微鏡写真である。写真中、矢印はニューロンを、矢の根部分はニューロメラニン、バーの単位は50 μ mである。

第27図より、SN (青斑を含む) 中のメラニン含有ニューロンは、PD患者および健常人中では強度に染色されたのに対し、AR-JP患者では染色されなかった (図中A, D, G)。また、SN中のメラニン含有ニューロンでは、細胞質、顆粒構造、およびニューロン突起は均一に染色されたが核は染色されず、グリア細胞では

弱い染色が見られた（図中A～F）。一方、PD患者および健常人については、被殻および前頭皮質小葉中のニューロンは、細胞質および核周囲構造で弱く染色された（図中B，C，E，F）。

また、第28図は、脳切片中の本発明遺伝子、ポリユビキチン、及びアルファシヌクレインを免疫組織化学染色した顕微鏡写真であり、図中A～Cは、PD患者（ケース1）のSN中メラニン含有ニューロンで、抗パーキン抗体M-74（Aの緑部分）及びモノクローナル抗ポリユビキチン抗体（Bの赤部分）が二重染色された写真；D～FはPD患者（ケース1）の中脳横断面図で、抗アルファシヌクレイン抗体が染色された写真；G～IはPD患者（ケース1）の中脳横断面図で、抗パーキン抗体M-74が染色された写真を夫々示す。図中、矢の根部分はLewy body，バーの単位は50 μ mである。

二重免疫蛍光を行った結果、SN中メラニン含有ニューロンのLewy bodyでは、抗パーキン抗体および抗ポリユビキチン抗体の両方が染色された（図中A～C）。また、中脳横断面の染色結果より、PD患者のLewy bodyでは本発明遺伝子およびアルファシヌクレインの両方が局在化していることが分かった（図中D，E，G，H）。これに対し、AR-JP患者の脳組織では、このような染色は見られなかった（データは示さず）。

以上の結果より、本発明蛋白質は、散在性PD患者及び健常人の脳中に観察されるのに対し、AR-JP患者の脳中には観察されないことが分かった。また、PD患者のLewy bodyのなかには本発明蛋白質が観察された。

実施例16：若年性パーキンソン病患者における本発明遺伝子の
イムノブロット分析

実施例15に引続き、本発明蛋白質に対する抗体を用い、AR-JP

J P 患者、P D 患者、及び健常人の脳中に存在する本発明遺伝子をイムノブロット分析した。

まず、上記被験者の前頭皮質小葉、黒質、および被殻の組織ブロックを、Potter-Elvehjem ホモジナイザーを用い、等張シュクロース溶液（10mM の Tris-HCl pH7.4, 0.32M のシュクロース, 1mM の酢酸亜鉛, 15 μ g/m のロイペプチン, 5 μ g/ml の p-アミジノフェニルメタンスルホンフルオリドの塩酸塩（APMSF）及び 50ng/ml のペプスタチンを含む）でホモジナイズした。得られたホモジネート液を 4 回遠心分離し、細胞核分画（600 \times g で 10 分間遠心分離したベレット）、ミトコンドリア分画（7000 \times g で 10 分間遠心分離したベレット）、ミクロソーム分画（100,000 \times g で 1 時間遠心分離したベレット）、及びサイトソール分画（900,000 \times g で 1 時間遠心分離した後の上清）を得た。更に 900,000 \times g のベレットを、0.25M シュクロース含有 TES 緩衝液で再懸濁した後、シュクロースを密度勾配法により積層した（0.25M, 0.86M 及び 1.3M）後、SW28 ローターで、4 $^{\circ}$ C、28,000rpm で 1 時間遠心分離した。上層の脂質を吸引した後、0.5M のシュクロース層と 0.86M のシュクロース層の間の中間面をゴルジ分画として集めた。

これら種々の分画中の蛋白質は、10% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動によって分離した後、PVDF 膜ブロット（Bio-Rad）に移した。このブロットは、0.05% の Tween20 及び 5% ウシ血清アルブミン含有 Tris 緩衝生理食塩水（10mM の Tris-HCl, pH7.6 及び 150mM の NaCl を含む）中で、52 $^{\circ}$ C で 1 時間浸漬した後、4 $^{\circ}$ C で一晩、ブロッキング溶液中にて、抗パーキン抗体 M-74 等の種々の抗体でプローブした。次いで、0.05% Tween20 含有 Tris 緩衝生理食塩水で洗浄した。内部コントロールとして抗 β -チューブュリン抗体（Amersham Life Science,

Arlington, IL) を用い、Golgi マーカーとして抗 γ -アダプチン抗体 (Sigma) を用いた。次に、このプロットを、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG (Dako) および抗マウス IgG (Dako) で室温にて 1 時間処理した。得られた反応産物は化学蛍光試薬 (chemi-luminescence) (Amersham, Buckinghamshire, UK) で可視化した。

得られた結果を第 29 図～第 31 図に示す。これらは、抗パーキン抗体 M-74 を用い、種々のホモジネートにおける本発明蛋白質のイムノブロット分析結果を示す顕微鏡写真であり、このうち第 29 図は、3 名の健常人 (ケース 1～3)、3 名の PD 患者 (ケース 1～3)、及び 2 名の AR-JP 患者 (ケース 1, 2) の前頭皮質小葉全ホモジネート (左側のゲルはサイズマーカー、 β -チューブリンは内部マーカーである) ; 第 30 図は、健常人 (ケース 1) の前頭皮質小葉組織の亜細胞分画 (左から順に核、ミトコンドリア、ミクロソーム、サイトソル、及びゴルジ体を夫々示す。尚、 γ -アダプチンはゴルジマーカーである) ; 第 31 図は 2 名の健常人 (ケース 1, 2) 及び 2 名の PD 患者 (ケース 2, 3) における SN、被殻及び前頭皮質小葉の全ホモジネートの結果を夫々示す。

その結果、PD 患者および健常人の前頭皮質小葉全ホモジネート中には 52 kDa の本発明蛋白質 (図中、Parkin と示す) が検出されたのに対し、AR-JP 患者の前頭皮質小葉全ホモジネート中では検出されなかった (第 29 図)。また、PD 患者には、41kDa の二番目の蛋白質バンド、おそらくパーキン蛋白質のプロセシングされた型が見られた。尚、抗体 M-74 の代わりに抗体 M-73 を用いても同様の結果が得られた (データは示さず)。

また、健常人の前頭皮質小葉ホモジネートの亜細胞分画では、サイトソル分画およびゴルジ分画中に本発明蛋白質の大部分が検出さ

れたのに対し、ミクロソーム分画では、少量の蛋白質しか検出されなかった（第30図）。

更に、健常人およびPD患者のSN、被殻および前頭皮質小葉のホモジネートをイムノブロットした結果、SN中には脳の他の部分に比べ、本発明蛋白質が豊富に存在していた（第31図）。このうちPD患者のSN中の本発明蛋白質は、黒質ニューロンの減少に従って明らかに減少していた。

以上の実験結果より、本発明蛋白質は、AR-JP患者の脳のいずれの領域においても検出されるのではなく、SN中のメラニン含有ニューロンに存在することが明らかになった。

実施例17：散発性パーキンソン病（PD）患者および健常人におけるパーキンの多型

本実施例では、PDにおける多型頻度を調査した。詳細には、160名のPD患者、および神経変性疾病の見られない160名の健常人を対象にし、以下の要領で遺伝性多型について分析した。尚、本実施例では40歳以下で発症した患者は除いており、発症平均年齢は55.4±10.7歳であった。PD患者の家族にはPDの履歴を有するものではなく、症状の日周変動も見られなかった。また、健常人の年齢は40～98歳であった。

まず、上記被験者のゲノムDNAを末梢白血球から抽出し、抽出直後に用いるか、或いは分析時まで-20℃で保存した。本発明遺伝子のエクソン4及び10は、2個のプライマー対を用いてPCR法により増幅した（エクソン4：順方向のプライマー、5'-acaagcttttaagagtttcttgt-3'、逆方向のプライマー、5'-aggcaatgtgttagtacaca-3'、エクソン10：順方向のプライマー、5'-attgccaaatgcaacctaattgtc-3'、逆方向のプライマー、5'-ttggaggaatgagtagggcatt-3'）。

エクソン 4 には 167 位の S e r を A s n (S 1 6 7 N) に置換させる多型 (G → A) 、エクソン 1 0 には 366 位の A r g を T r p (R 3 6 6 W) に置換させる多型 (C → T) 、および 380 位を V a l から L e u に置換 (V 3 8 0 L) させる多型 (G → C) が存在した。S 1 6 7 N の対立遺伝子については制限酵素 A l w N I により (野生型のみ切断される)、R 3 6 6 W の対立遺伝子は制限酵素 N c i I により (野生型のみ切断される)、また V 3 8 0 L の対立遺伝子は制限酵素 B s p 1 2 8 6 I によって (変異型のみ切断される) それぞれ野生型と変異型を識別できる。

詳細には、P C R 産物を 3 % アガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウムで可視化した結果、A l w N I では 5 0 b p / 1 3 1 b p のバンド [第 3 2 図の A)] ; N c i I では 6 8 b p / 9 7 b p のバンド [第 3 2 図の B)] ; B s p 1 2 8 6 I では 5 7 b p / 1 0 8 b p のバンド [第 3 2 図の C)] が夫々検出された (第 3 2 図) 。

尚、エクソン 4 に対する P C R 条件は以下の通りである。最初に 9 4 ° C で 1 0 分間の変性を行い、次いで 9 4 ° C で 3 0 秒間の変性、5 3 ° C で 1 分間のアニーリング、7 2 ° C で 1 分間のエクステンションを 1 サイクルとして合計 4 0 サイクル行った後、最後に 7 2 ° C で 1 0 分間のエクステンションを行う。また、エクソン 1 0 に対する P C R 条件は以下の通りである。最初に 9 4 ° C で 1 0 分間の変性を行い、9 4 ° C で 3 0 秒間の変性、5 5 ° C で 3 0 秒間のアニーリング、7 2 ° C で 4 5 秒間のエクステンションを 1 サイクルとして 4 0 サイクル行った後、最後に 7 2 ° C で 1 0 分間のエクステンションを行う。

上記被験者について、野生型ホモ接合体 (w / w) 、野生型 / 変異型ヘテロ接合体 (w / m) 、及び変異型ホモ接合体 (m / m) の頻度を調べた。

表 4 及び表 5 に、S 1 6 7 N における対立遺伝子頻度および遺伝

子型の頻度を示す。尚、表 5 中の予想頻度はハーディ・ワインベルグの平衡則に従って計算した。

表 4

	健常人(%)	PD(%)	合計(%)
被験者の数	160	160	320
クロモソームの数	320	320	640
対立遺伝子G	180(56.3%)	181(56.6%)	361(56.4%)
対立遺伝子A	140(43.7%)	139(43.4%)	279(43.6%)
$\chi^2 = 0.006$, d.f. = 0.936 ^a			

a : 対立遺伝子頻度はPD患者と健常人の間で有意差なし。

注: 予想頻度はHardy-weinbergの平衡則に従って算出した。

表 5

	健常人(%)		PD(%)		合計(%)
	観察頻度	予想頻度	観察頻度	予想頻度	
GG	58(36.3%)	51	59(36.9%)	51	117(36.6%)
GA	64(40.0%)	79	63(39.4%)	79	127(39.7%)
AA	38(23.7%)	30	38(23.7%)	30	76(23.7%)
$\chi^2 = 2.97$, d.f. = 2, p = 0.227 ^b $\chi^2 = 3.33$, d.f. = 2, p = 0.189 ^c					
$\chi^2 = 0.016$, d.f. = 2, p = 0.992 ^d					

b: 健常人の遺伝子型頻度についての χ 自乗検定の各値

c: PD患者の遺伝子型頻度についての χ 自乗検定の値

d: 遺伝子型頻度はPD患者と健常人の間で有意差なし。

上記結果によれば、対立遺伝子及び遺伝子型の頻度は、PD患者と健常人の間で、いずれも有意な差は見られなかった。また、167位Serのホモ接合体及び167位のSerがAsnへ置換したヘテロ接合体の頻度は、両者の間で有意な差は見られなかった。

更に表5より、3種の遺伝子型の観察頻度は、健常人の予想頻度との間でも、患者の予想頻度との間でも有意な差は見られないことが分かった。尚、コンピューター解析により、この置換によって遺伝子産物の二次構造は変化していないことが明らかになった。

次に、V380Lにおける対立遺伝子頻度および遺伝子型の頻度を表6に示す。

表6

	健常人(%)	PD(%)	合計(%)
被験者の数	160	160	320
クロモソームの数	320	320	640
対立遺伝子G	309(96.6%)	314(98.1%)	623(97.3%)
対立遺伝子C	11(3.4%)	6(1.9%)	17(2.7%)
$\chi^2 = 1.51, \text{d.f.} = 1, p = 0.219^a$			

a: 対立遺伝子頻度はPD患者と健常人の間で有意差なし。

表6に示す通り、V380Lにおける対立遺伝子頻度は、PD患者と健常人の間で有意な差は見られなかった。また、その観察頻度は予想頻度と一致しており、多型変異によって遺伝子産物の二次構造は変化しないことも確認した。

次に、R366Wにおける対立遺伝子頻度および遺伝子型の頻度を表7に示す。

表 7

	健常人(%)	PD(%)	合計(%)
被験者の数	160	160	320
クロモソームの数	320	320	640
対立遺伝子C	306(95.6%)	316(98.8%)	622(97.2%)
対立遺伝子T	14(4.4%)	4(1.2%)	18(2.8%)
$\chi^2 = 5.72, \text{d.f.} = 1, p = 0.017^a$			

a: 対立遺伝子頻度はPD患者と健常人の間で有意差あり。

(Fisher's exact probability test, $p = 0.014 < 0.02$,

Odds ratio = 3.60, 95%CI: 0.45-6.50).

R 3 6 6 Wにおいては、3種の遺伝子型の予想頻度は、PD患者および健常人の間で全く差がなかったが、R 3 6 6 Wの対立遺伝子頻度は、PD患者と健常人の間で有意な差が見られた。即ち、PD患者の対立遺伝子頻度は1.2%であるのに対し、健常人では4.4%であり、PD患者は健常人に比べて有意に低下していた。また、この対立遺伝子の保有についての健常人とPD患者間の違いの程度(odd ratio)は3.60であった。

また第33図は、R 3 6 6 Wのアミノ酸配列の hydropathy Index をグラフ化したものであり、+は疎水性領域を、-は親水性領域を夫々示す。図中の矢印部分では、366位のArgがTrpに置換したため、親水性から疎水性へ変化したことを示している。

更に第34図はR 3 6 6 Wにおける二次構造の変化を示す図であり、366位のArgがTrpに置換したため、361位から376位の α ヘリックス部分が β シート構造(360位から360位)へ変化したことが分かる。

以上の結果より、上述した3個の多型のうちS 1 6 7 N及びV 3

80LはPDへの影響はないと考えられるのに対し、R366Wの遺伝子頻度はPD患者で非常に低く、上記 odd ratio が3.60と算出されたことから、この対立遺伝子はPD発症阻止因子ではないかと示唆される。

産業上の利用可能性

本発明は以上の様に構成されており、パーキンソン病に関与する遺伝子が明らかにされたのみならず、該遺伝子の一部が欠失や変異等すると本疾患を惹起することも明白になった。従って、上記遺伝子の異常の有無を検出すれば本疾患の発症を容易に判断することが可能になり、パーキンソン病の早期発見に極めて有用である。

また、本発明遺伝子をパーキンソン病患者に導入して治療を行う所謂遺伝子治療も可能であり、本遺伝子を用いて得られる組換え蛋白質はパーキンソン病の予防・治療用医薬として有用である他、この組換え蛋白質に対する抗体（モノクローナル抗体やポリクローナル抗体）も本疾患の診断に用いることができる。更にこの組換え蛋白質を用いれば、パーキンソン病の予防・治療・診断に極めて有用な医薬物質も合成し得る等、パーキンソン病を中心とする種々の遺伝子治療・医薬物質等への発展に寄与できる点で本発明は極めて意義深いものである。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 または 2 に記載の塩基配列全長、またはその部分的配列、又はそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなり、且つパーキンソン病に關与する DNA または遺伝子。

2. 請求項 1 に記載の塩基配列、またはそれを含有する、またはそれらを部分的に含有する塩基配列からなり、

且つ、その遺伝的欠損がパーキンソン病の原因となる DNA または遺伝子、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなる DNA または遺伝子。

3. 請求項 1 または 2 に記載の塩基配列であって、

オルタナティブスプライシングによるバリエーションとして生じ、パーキンソン病に關与する塩基配列の DNA または遺伝子、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなる DNA または遺伝子。

4. 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の塩基配列であり、その遺伝子産物が、配列表の配列番号 1 に記載の 1 ～ 465 のアミノ酸配列からなる蛋白質、または配列表の配列番号 2 に記載の 1 ～ 437 のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同等の機能を有する蛋白質をコードする遺伝子。

5. 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の塩基配列に対して、エクソンの欠失、ナンセンス塩基置換、ミスセンス塩基置換、塩基の欠失、塩基の付加、塩基の挿入、スプライシングの異常、フレームシフトを生じさせた遺伝子、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなり、

且つ、パーキンソン病に關与する DNA または遺伝子。

6. 請求項 1～5 のいずれかに記載の DNA または遺伝子の部分的塩基配列をもつ DNA または遺伝子、または遺伝子断片、またはそれら若しくはそれらの相補鎖にハイブリダイズする塩基配列からなる DNA または遺伝子、または遺伝子断片。

7. 以下の (a) または (b) の蛋白質をコードする遺伝子。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の 1～465 のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に關与する蛋白質。

8. 以下の (c) または (d) の蛋白質をコードする遺伝子。

(c) 配列表の配列番号 2 に記載の 1～437 のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(d) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に關与する蛋白質。

9. 請求項 1～8 のいずれかに記載の DNA 断片または遺伝子を含む組換えベクター。

10. 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列長は、12 個の各エクソン間に 11 個のイントロン配列をゲノム上で介在させており、該塩基配列の内 102～1496 の部分的配列には、1～465 のアミノ酸配列をもつ蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

11. 前記エクソンとイントロンの境界領域におけるイントロンの塩基配列は、下記構成よりなるものである請求項 10 に記載の遺伝子。

エクソン 1 とエクソン 2 の間に介在するイントロンは、エクソン 1 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列を有

し、エクソン 2 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 2 とエクソン 3 の間に介在するイントロンは、エクソン 2 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列を有し、エクソン 3 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 3 とエクソン 4 の間に介在するイントロンは、エクソン 3 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 7 に記載の塩基配列を有し、エクソン 4 の 5' 末端に隣接しては配列表の配列番号 8 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 4 とエクソン 5 の間に介在するイントロンは、エクソン 4 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 9 に記載の塩基配列を有し、エクソン 5 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 10 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 5 とエクソン 6 の間に介在するイントロンは、エクソン 5 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 11 に記載の塩基配列を有し、エクソン 6 の 5' 末端には配列表の配列番号 12 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 6 とエクソン 7 の間に介在するイントロンは、エクソン 6 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 13 に記載の塩基配列を有し、エクソン 7 の 5' 末端には配列表の配列番号 14 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 7 とエクソン 8 の間に介在するイントロンは、エクソン 7 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 15 に記載の塩基配列を有し、エクソン 8 の 5' 末端には配列表の配列番号 16 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 8 とエクソン 9 の間に介在するイントロンは、エクソン

8 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列を有し、エクソン 9 の 5' 末端には配列表の配列番号 18 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 9 とエクソン 10 の間に介在するイントロンは、エクソン 9 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 19 に記載の塩基配列を有し、エクソン 10 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 20 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 10 とエクソン 11 の間に介在するイントロンは、エクソン 10 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 21 に記載の塩基配列を有し、エクソン 11 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 22 に記載の塩基配列を有し、

エクソン 11 とエクソン 12 の間に介在するイントロンは、エクソン 11 の 3' 末端に隣接して配列表の配列番号 23 に記載の塩基配列を有し、エクソン 12 の 5' 末端に隣接して配列表の配列番号 24 に記載の塩基配列を有する。

12. 配列表の配列番号 1 に記載の 1～465 のアミノ酸配列、または配列表の配列番号 2 に記載の 1～437 のアミノ酸配列からなり、且つ、パーキンソン病に関与する蛋白質、またはそれと実質的に同等の機能を有する蛋白質。

13. 請求項 1～4 のいずれかに記載の遺伝子から発現するパーキンソン病に関与する蛋白質、またはそれと同一または実質的に同等の機能を有する蛋白質。

14. 請求項 5 に記載の遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列からなり、且つ、パーキンソン病に関与する蛋白質、またはそれと同一または実質的に同等の機能を有する蛋白質。

15. 請求項 14 に記載のアミノ酸配列のうち、1カ所以上でアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、パ

ーキンソン病に關与する蛋白質。

16. 以下の (a) または (b) の蛋白質。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の 1～465 のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に關与する蛋白質。

17. 以下の (c) または (d) の蛋白質。

(c) 配列表の配列番号 2 に記載の 1～437 のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(d) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つパーキンソン病に關与する蛋白質。

18. 請求項 10～17 のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の内 1～72 のユビキチン様部分的アミノ酸配列を含有し、

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の内 418～449 のジंकフィンガー蛋白質様部分的アミノ酸配列を含有する蛋白質。

19. 請求項 10～17 のいずれかに記載のアミノ酸配列の部分断片からなる、または該部分断片を含有する、または該アミノ酸配列の全長を含有するポリペプチドまたは蛋白質。

20. 請求項 12～17 のいずれかに記載の蛋白質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体。

21. 請求項 1～8 のいずれかに記載の DNA または遺伝子の塩基配列、遺伝的変異、欠損、発現量を調べることに用いるか、或いはそれらの濃縮に用いるプライマーまたはプローブまたは固定化核酸または DNA チップ。

22. 請求項1～8のいずれかに記載のDNAまたは遺伝子から転写、プロセシングされるRNAの塩基配列、遺伝的変異、欠損、発現量を調べることに用いるか、或いはそれらの濃縮に用いるプライマーまたはプローブまたは固定化核酸またはDNAチップ。

23. 配列表の配列番号1または配列番号2に記載の各エクソン配列の塩基配列、遺伝的変異、欠損を調べることに用いるか、或いはその遺伝子座のハプロタイピングに用いるプライマーまたはプローブまたは固定化核酸またはDNAチップ。

24. 請求項11に記載の各イントロン配列の塩基配列、遺伝的変異、欠損を調べることに用いるか、或いはその遺伝子座のハプロタイピングに用いるプライマーまたはプローブまたは固定化核酸またはDNAチップ。

25. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン1と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号25に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号26に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

26. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン2と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号27に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号28に記載の塩基配

列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

27. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン3と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号29に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号30に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

28. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン4の塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号31に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号32に記載の塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

29. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン4と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号33に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号34に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

30. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン5と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べるこ

とに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 35 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 36 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

31. 請求項 1 に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 6 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 37 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 38 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

32. 請求項 1 に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 7 の塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 39 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 40 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

33. 請求項 1 に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 7 の塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列

番号 4 1 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 2 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

3 4 . 請求項 1 に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 8 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 3 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 4 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

3 5 . 請求項 1 に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 9 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 5 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 6 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

3 6 . 請求項 1 に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン 1 0 と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号 1 のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 7 に記載の塩基配列を有し、配列番号 1 の相補鎖のゲノム上での 5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号 4 8 に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

37. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン11と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号49に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号50に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

38. 請求項1に記載のパーキンソン病関与遺伝子のエクソン12と隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるものであり、且つ下記塩基配列を有するものであることを特徴とするプライマーまたはプローブ。

配列番号1のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号51に記載の塩基配列を有し、配列番号1の相補鎖のゲノム上での5' - 3' 方向に沿って配列表の配列番号52に記載の塩基配列を有するものであるプライマーまたはプローブ。

39. 請求項24～38のいずれかに記載のプライマーまたはプローブの少なくとも1種を用い、パーキンソン病関与遺伝子のエクソンと隣接するイントロンの塩基配列、またはその遺伝子座を調べることに用いるプライマーまたはプローブ。

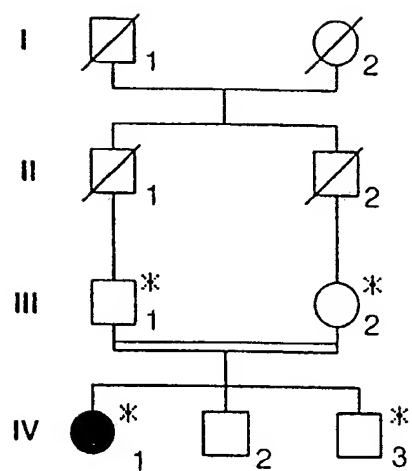
40. 請求項1～8のいずれかに記載の塩基配列の部分的配列からなるか、或いは請求項1～8のいずれかに記載の塩基配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体またはそれらの修飾物。

41. ヒトRNAを鋳型としたPCR法、ヒトcDNAを鋳型としたPCR法、またはRT-PCR法により、請求項1～8のいずれかに記載の全塩基配列または部分的塩基配列を増幅する、或いは

請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の全塩基配列または部分的塩基配列を部分的に含有して増幅するためのオリゴヌクレオチド。

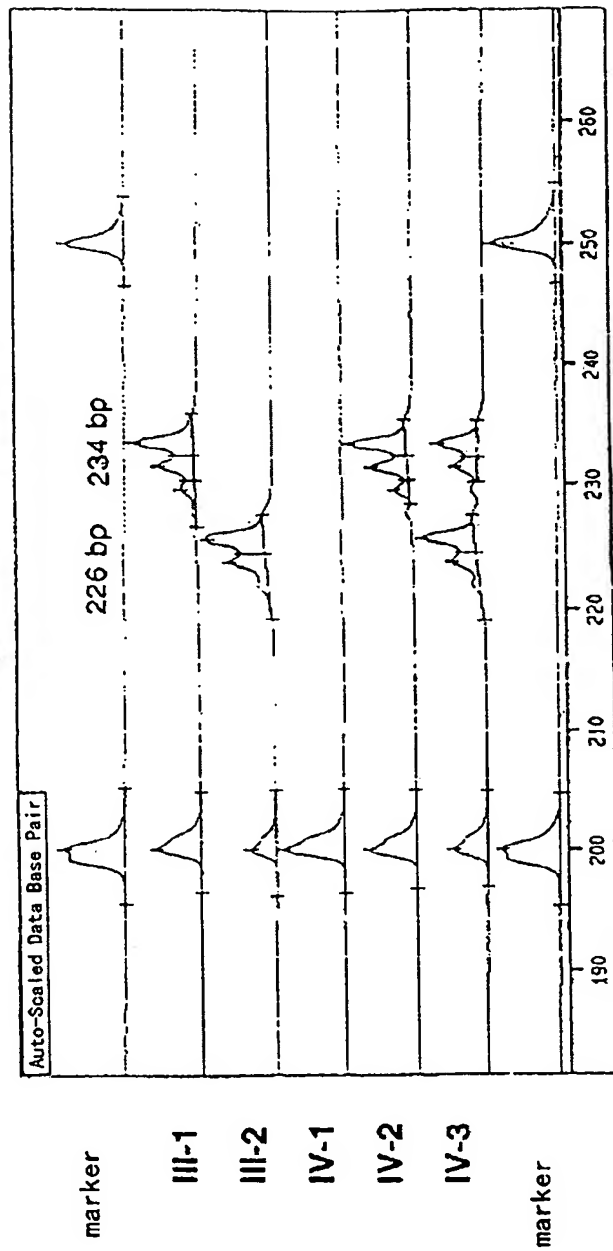
42. 配列表の番号 1 または 2 に記載のエクソンと、それらに隣接する請求項 11 に記載のイントロンを含有する塩基配列を P C R 法により増幅する、或いはその塩基配列の一部を P C R 法により増幅するためのオリゴヌクレオチド。

第1図

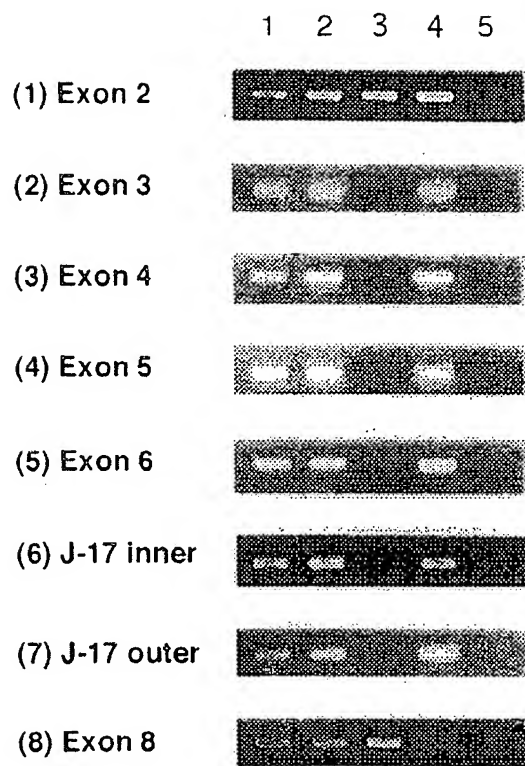


第2図

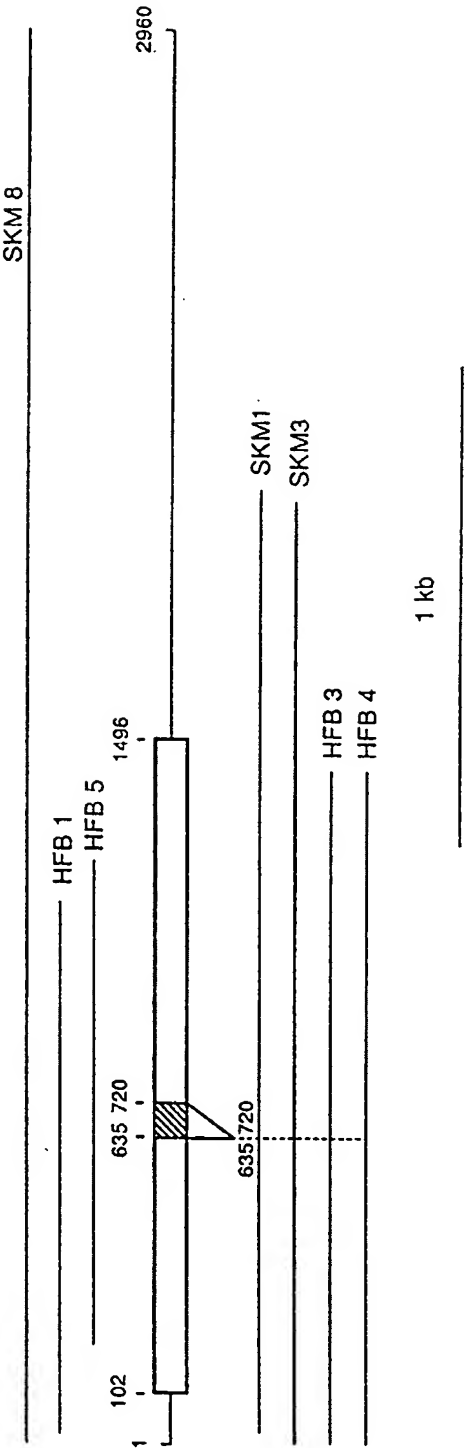
D6S305



第3図



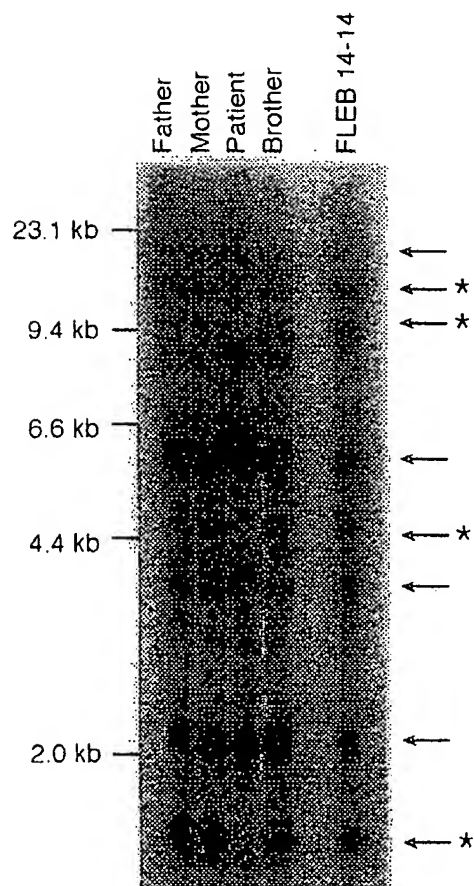
第4図



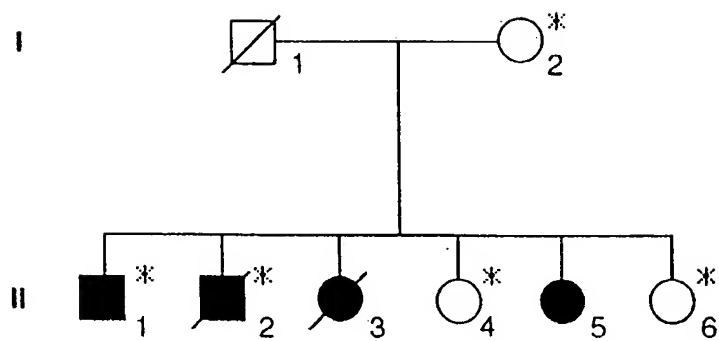
第5図

Parkin	Met	Ile	Val	Phe	Val	Arg	Phe	Asn	Ser	Ser	His	Gly	Phe	Pro	Val	Glu	Val	Asp	Ser	Asp
UBIQUITIN HUMAN	Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gyl	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu	Val	Glu	Pro	Ser
UBIQUITIN YEAST	Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gyl	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu	Val	Glu	Ser	Ser
UBIQUITIN SOYBEAN	Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gyl	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu	Val	Glu	Ser	Ser
					5					10					15					20
Parkin	Thr	Ser	Ile	Phe	Gln	Leu	Lys	Glu	Val	Val	Ala	Lys	Arg	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Asp	Gln
UBIQUITIN HUMAN	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Pro	Asp	Gln
UBIQUITIN YEAST	Asp	Thr	Ile	Asp	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Pro	Asp	Gln
UBIQUITIN SOYBEAN	Asp	Thr	Ile	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Pro	Asp	Gln
					25					30					35					40
Parkin	Leu	Arg	Val	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys	Glu	Leu	Arg	Asn	Asp	Trp	Thr	Val	Gln	Asn	Cys	Asp
UBIQUITIN HUMAN	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn
UBIQUITIN YEAST	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn
UBIQUITIN SOYBEAN	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ala	Asp	Tyr	Asn
					45					50					55					60
Parkin	Leu	Asp	Gln	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ile	Val	Gln	Arg	Pro	Trp	Arg	Lys				
UBIQUITIN HUMAN	Ile	Gln	Lys	Glu	Ser	Thr	Leu	His	Thr	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly				
UBIQUITIN YEAST	Ile	Gln	Lys	Glu	Ser	Thr	Leu	His	Thr	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly				
UBIQUITIN SOYBEAN	Ile	Gln	Lys	Glu	Ser	Thr	Leu	His	Thr	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly				
					65					70					75					

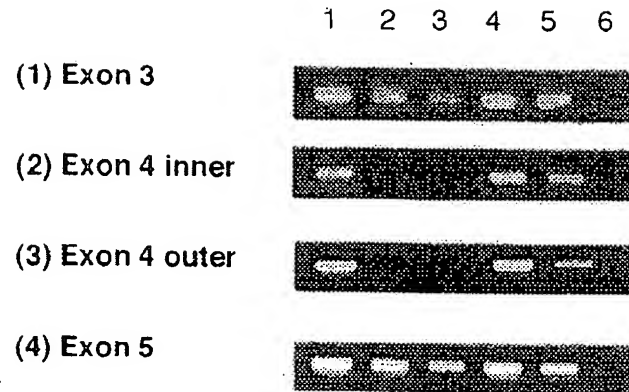
第6図



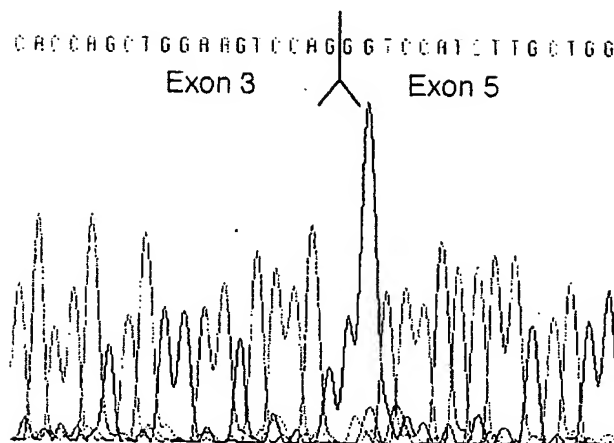
第7図



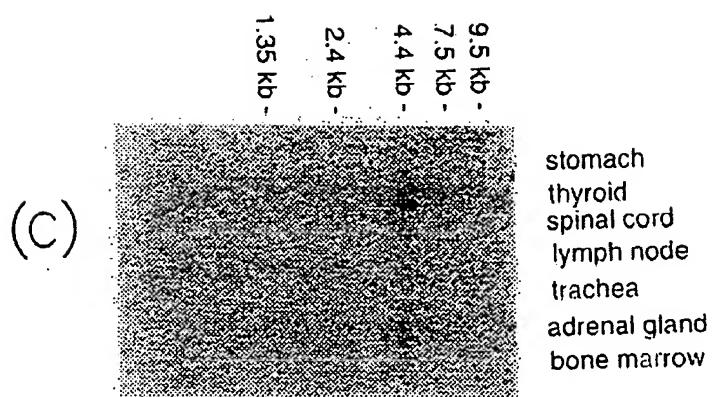
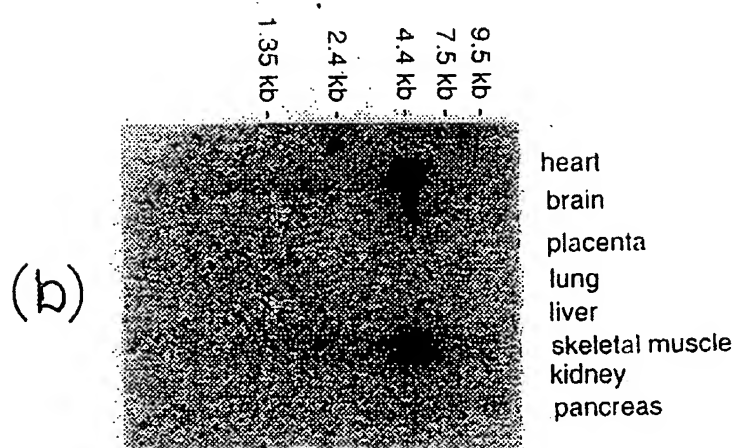
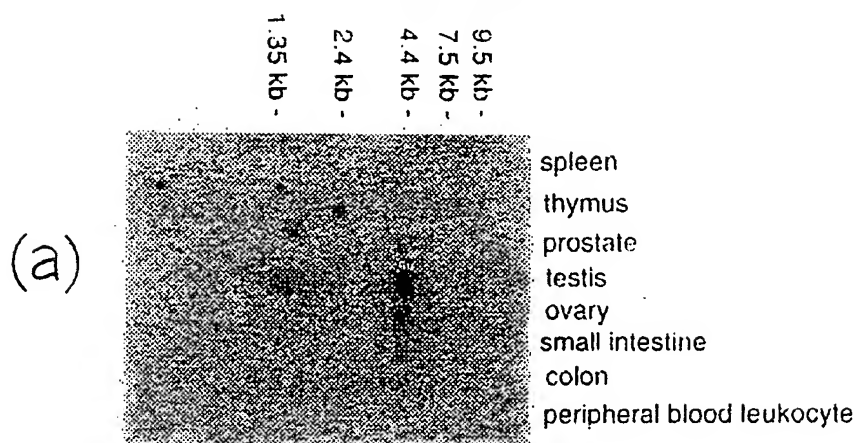
第8図



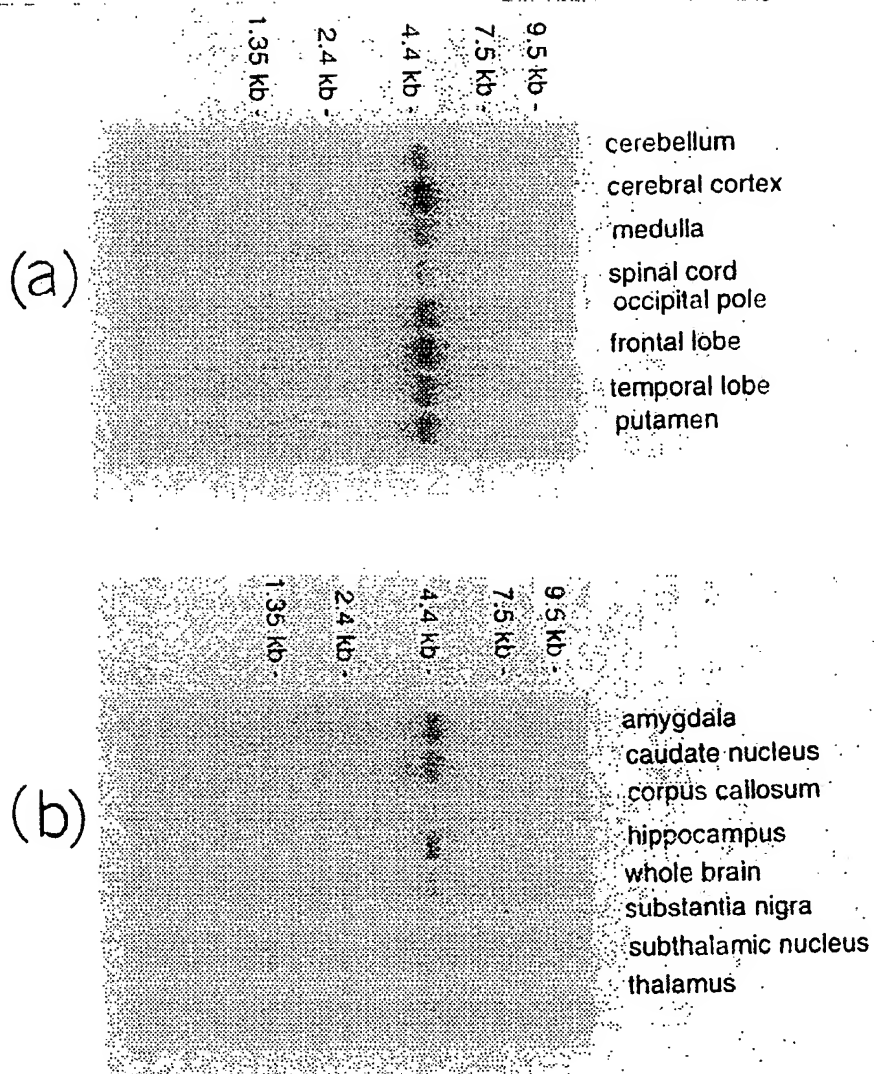
第9図



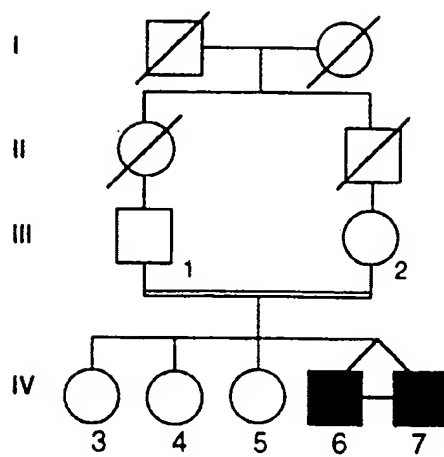
第10図



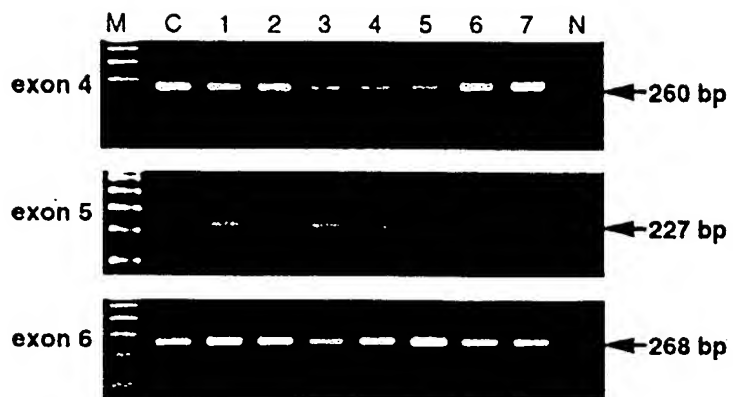
第11図



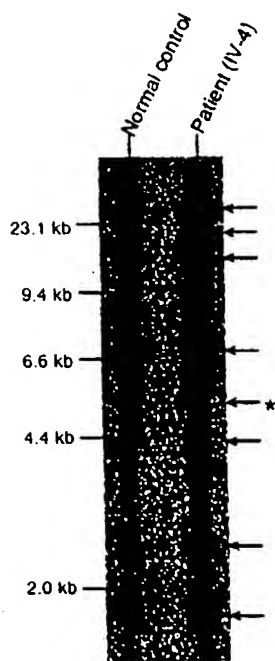
第12図



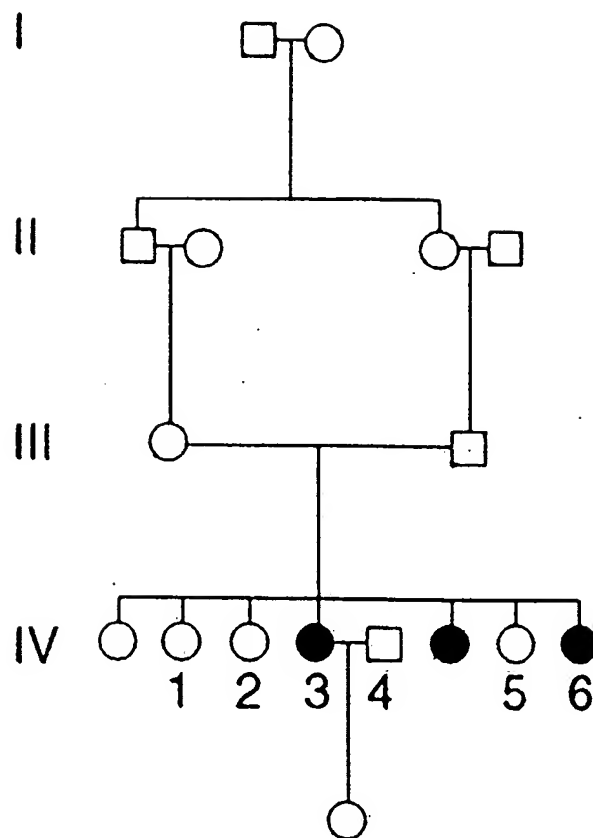
第13図



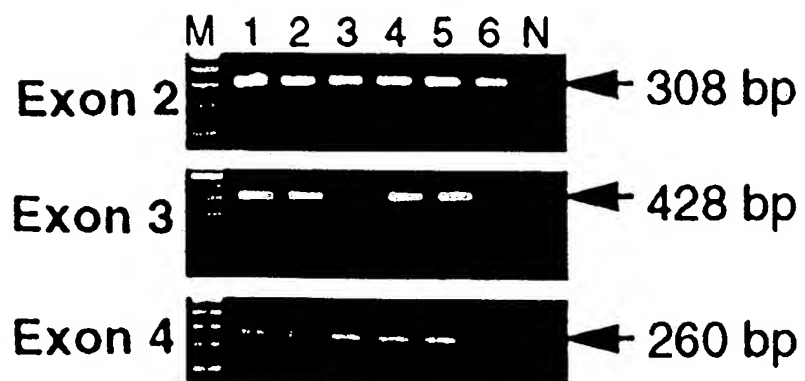
第14図



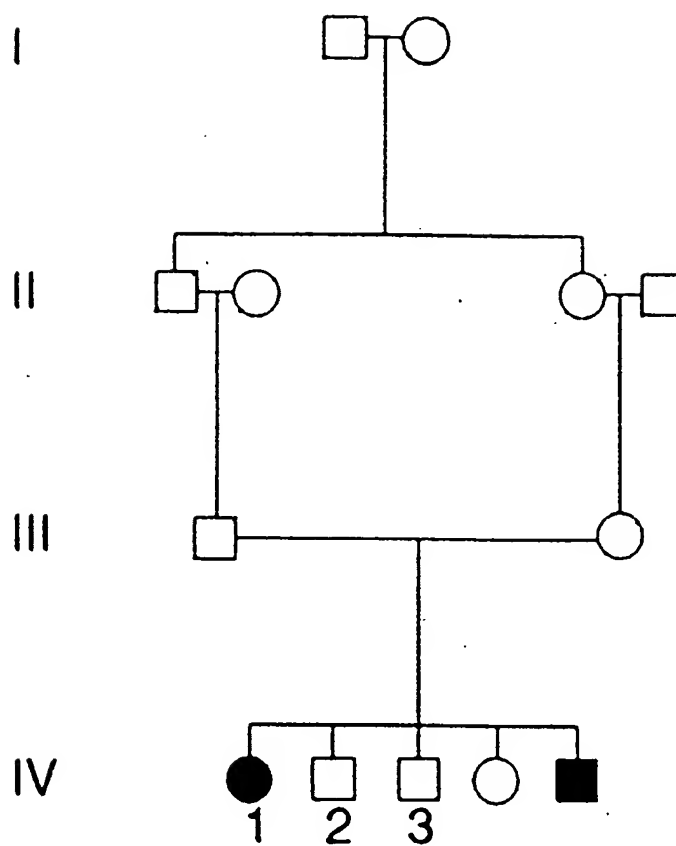
第15図



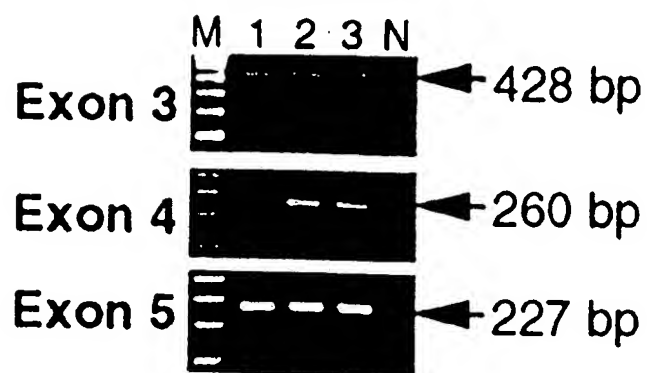
第16図



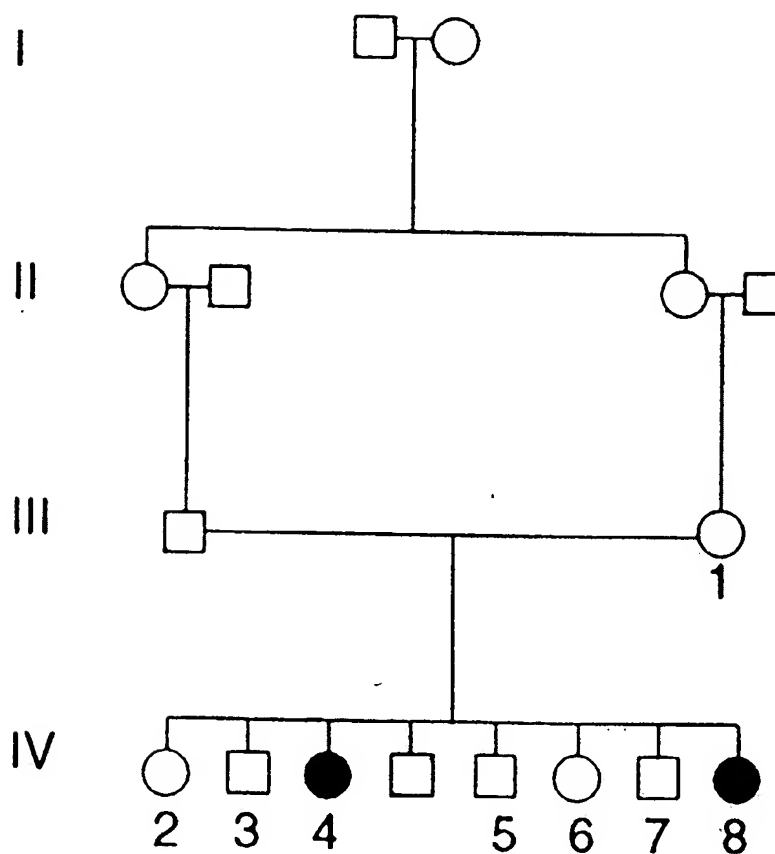
第17図



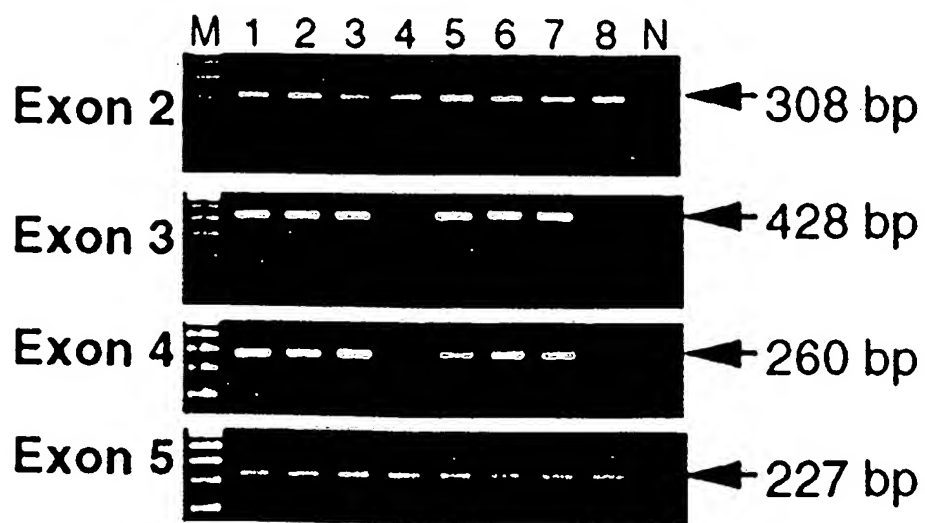
第18図



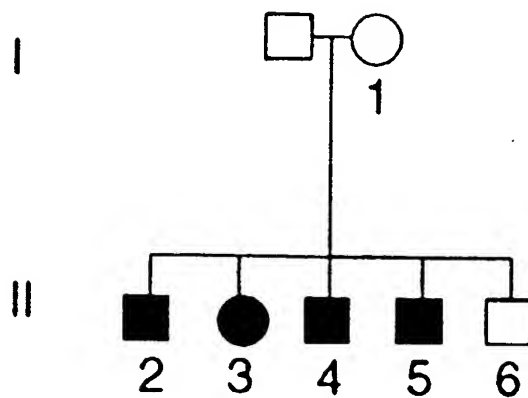
第19図



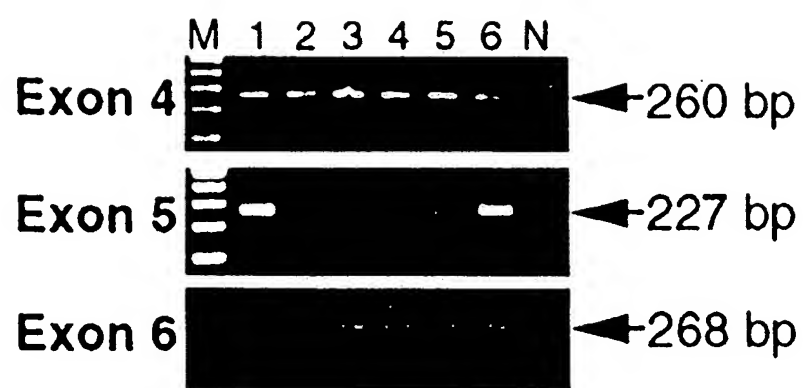
第20図



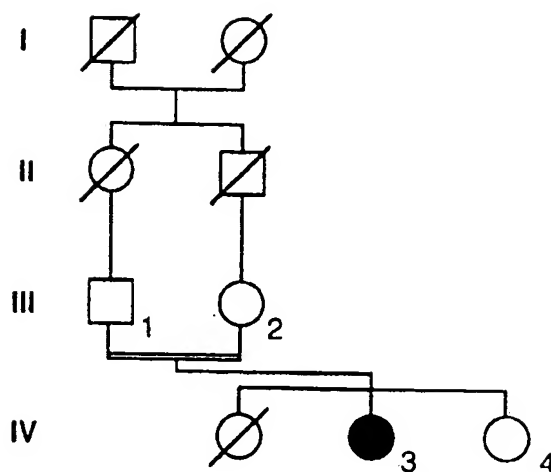
第21図



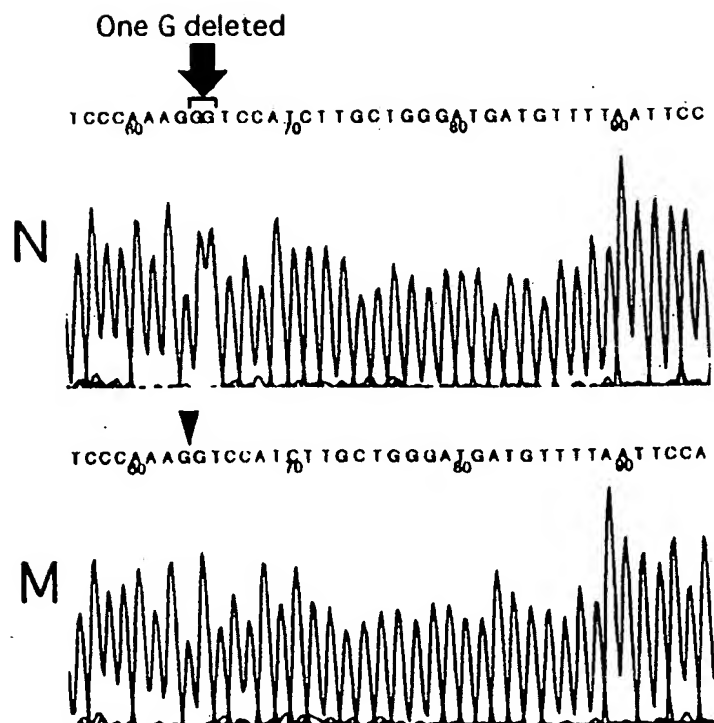
第22図



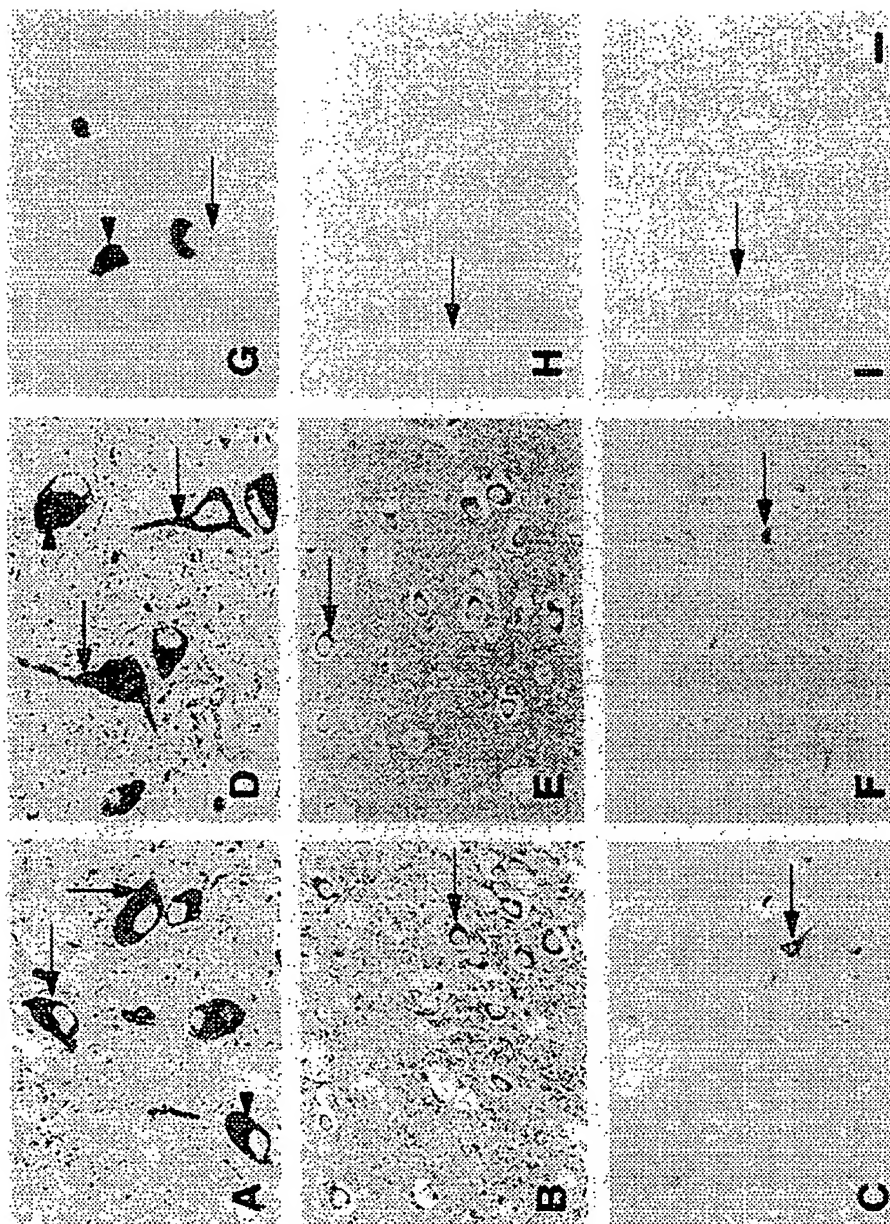
第23図



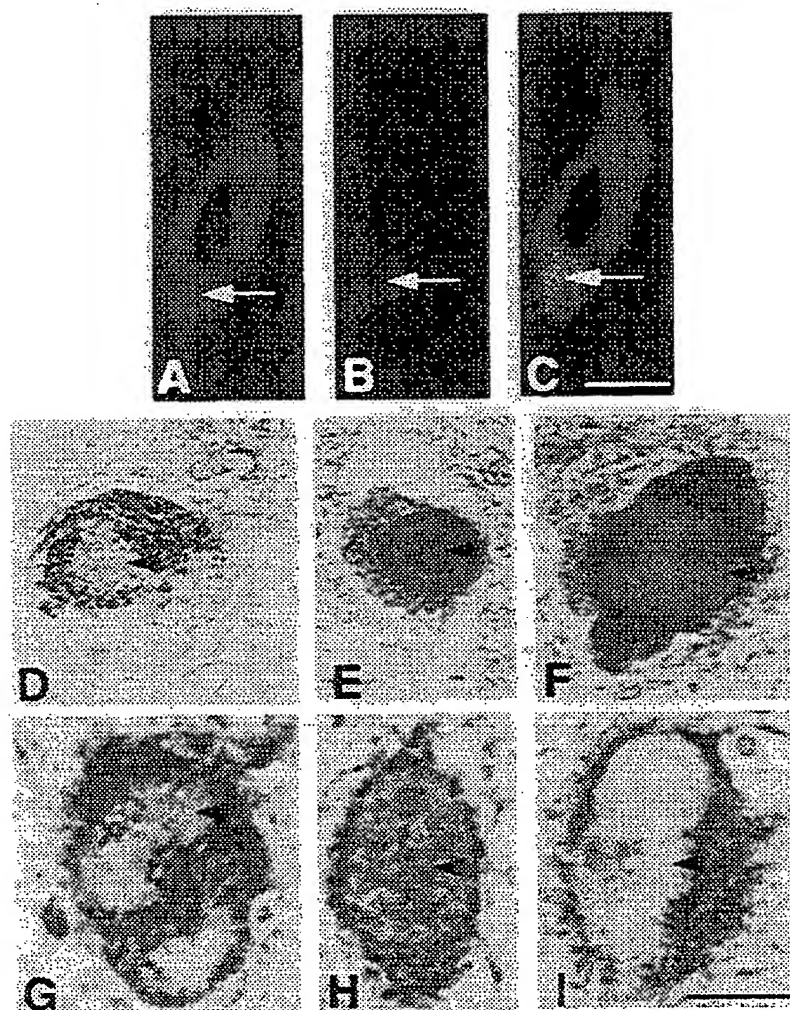
第24図



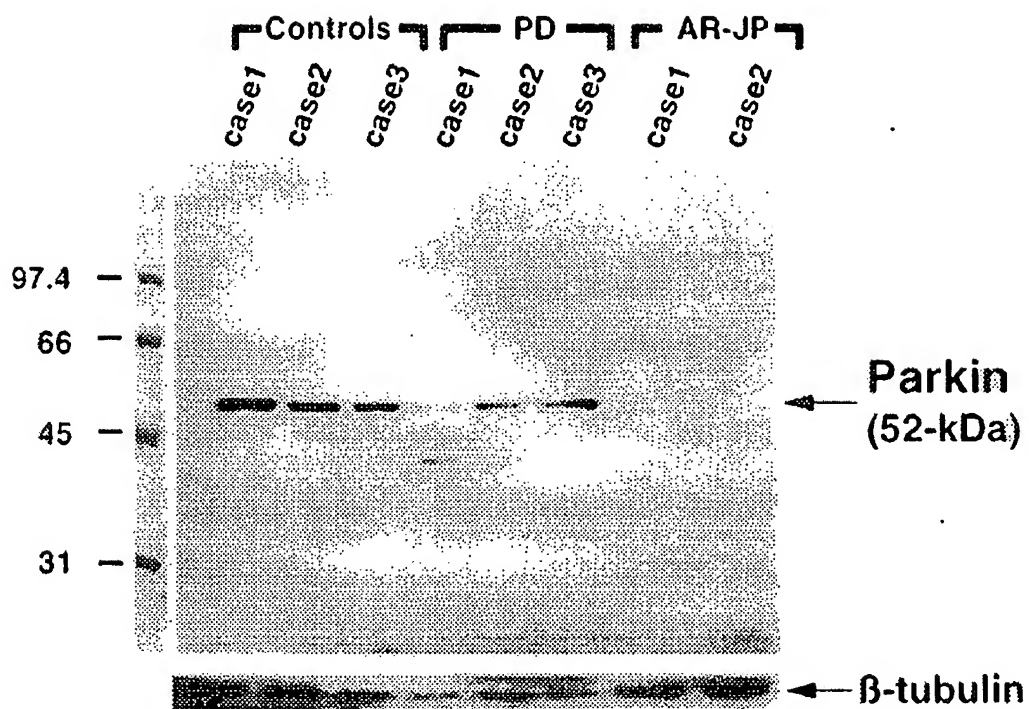
第27図



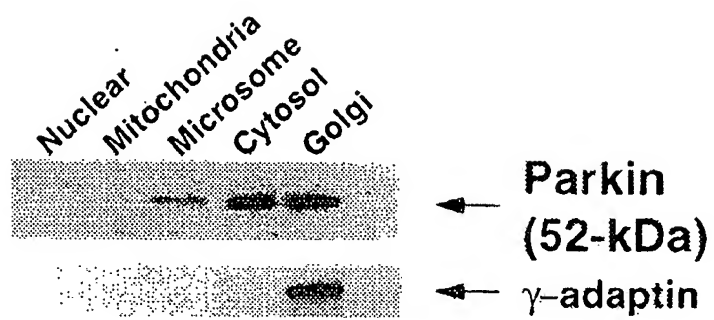
第28図



第29図



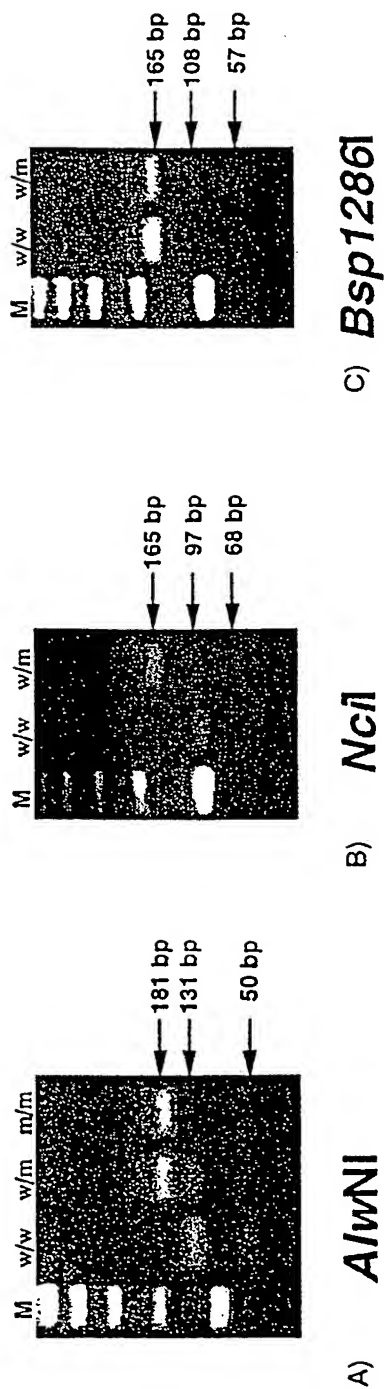
第30図



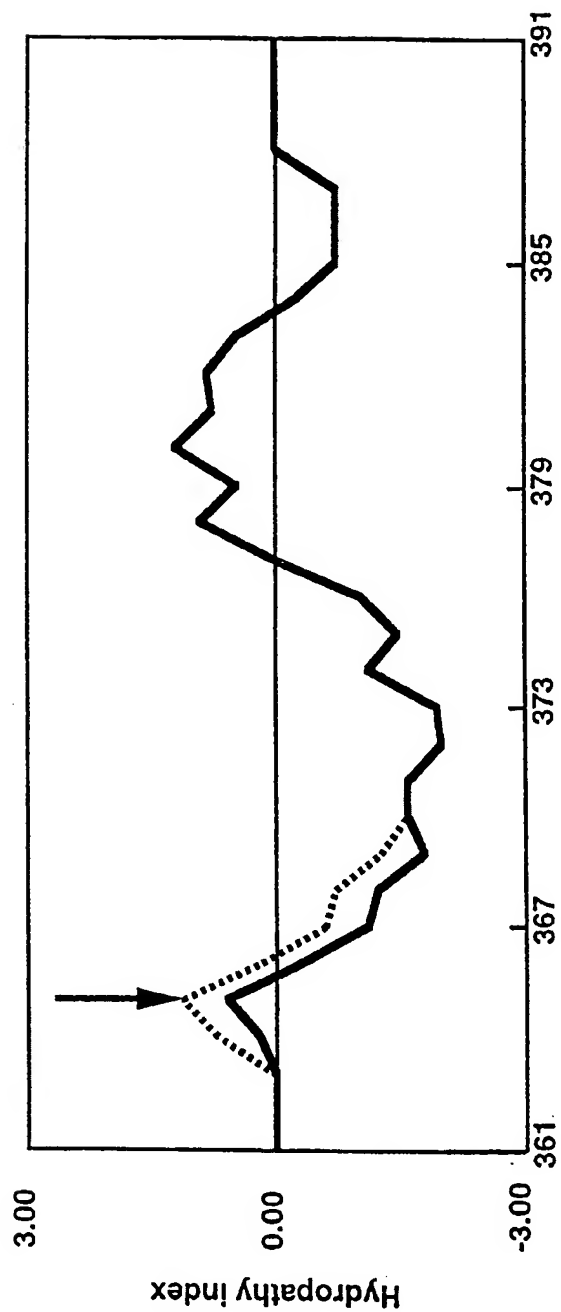
第31図



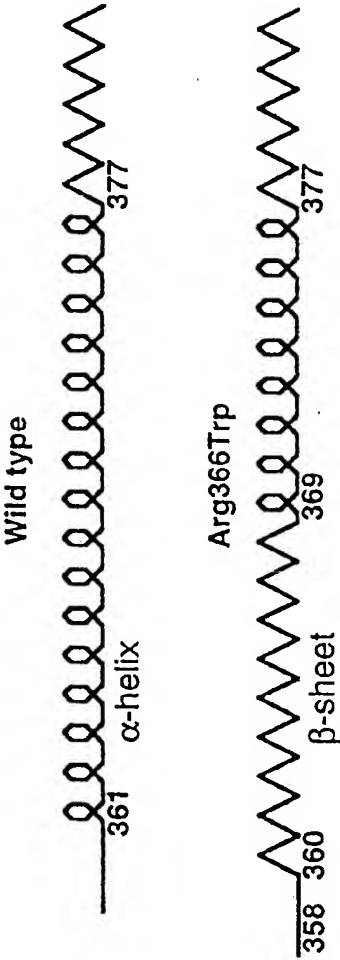
第32図



第33図



第34図



SEQUENCE LISTING

<110> Nobuyoshi Shimizu

Yoshiyuki Mizuno

<120> DNA or Gene responsible for Parkisonism

<130> P489PCT

<160> 52

<210> 1

<211> 2960

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> 102..1496

<221> exon 1

<222> 1..108

<221> exon 2

<222> 109..272

<221> exon 3

<222> 273..513

<221> exon 4

<222> 514..635

<221> exon 5

<222> 636..719

<221> exon 6

<222> 720..835

<221> exon 7

<222> 836..972

<221> exon 8

<222> 973..1034

<221> exon 9

<222> 1035..1184

<221> exon 10

<222> 1185..1268

<221> exon 11

<222> 1269..1386

<221> exon 12

<222> 1387..2960

<400> 1

ttcgggagga ttaccagga gaccgctggt gggaggcgcg gctggcgccg 50
ctgcgcgcatt ggccctgttc ctggcccgca gccgccacct acccagtgac 100
catg ata gtg ttt gtc agg ttc aac tcc agc cat ggt ttc 140

Met Ile Val Phe Val Arg Phe Asn Ser Ser His Gly Phe

1 5 10

cca gtg gag gtc gat tct gac acc agc atc ttc cag ctc 179
Pro Val Glu Val Asp Ser Asp Thr Ser Ile Phe Gln Leu

15 20 25

aag gag gtg gtt gct aag cga cag ggg gtt ccg gct gac 218
Lys Glu Val Val Ala Lys Arg Gln Gly Val Pro Ala Asp

30 35

cag ttg cgt gtg att ttc gca ggg aag gag ctg agg aat 257
Gln Leu Arg Val Ile Phe Ala Gly Lys Glu Leu Arg Asn

40 45 50

gac tgg act gtg cag aat tgt gac ctg gat cag cag agc 296

Asp Trp Thr Val Gln Asn Cys Asp Leu Asp Gln Gln Ser
 55 60 65
 att gtt cac att gtg cag aga ccg tgg aga aaa ggt caa 335
 Ile Val His Ile Val Gln Arg Pro Trp Arg Lys Gly Gln
 70 75
 gaa atg aat gca act gga ggc gac gac ccc aga aac gcg 374
 Glu Met Asn Ala Thr Gly Gly Asp Asp Pro Arg Asn Ala
 80 85 90
 gcg gga ggc tgt gag cgg gag ccc cag agc ttg act cgg 413
 Ala Gly Gly Cys Glu Arg Glu Pro Gln Ser Leu Thr Arg
 95 100
 gtg gac ctc agc agc tca gtc ctc cca gga gac tct gtg 452
 Val Asp Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Gly Asp Ser Val
 105 110 115
 ggg ctg gct gtc att ctg cac act gac agc agg aag gac 491
 Gly Leu Ala Val Ile Leu His Thr Asp Ser Arg Lys Asp
 120 125 130
 tca cca cca gct gga agt cca gca ggt aga tca atc tac 530
 Ser Pro Pro Ala Gly Ser Pro Ala Gly Arg Ser Ile Tyr
 135 140
 aac agc ttt tat gtg tat tgc aaa ggc ccc tgt caa aga 569
 Asn Ser Phe Tyr Val Tyr Cys Lys Gly Pro Cys Gln Arg
 145 150 155
 gtg cag ccg gga aaa ctc agg gla cag tgc agc acc tgc 608
 Val Gln Pro Gly Lys Leu Arg Val Gln Cys Ser Thr Cys
 160 165
 agg cag gca acg ctc acc ttg acc cag ggt cca tct tgc 647
 Arg Gln Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Gly Pro Ser Cys

170	175	180	
tg g gal gal gtt tta att cca aac cgg atg agt ggt gaa	686		
Trp Asp Asp Val Leu Ile Pro Asn Arg Met Ser Gly Glu			
185	190	195	
tgc caa tcc cca cac tgc cct ggg act agt gca gaa ttt	725		
Cys Gln Ser Pro His Cys Pro Gly Thr Ser Ala Glu Phe			
200	205		
ttc ttt aaa tgt gga gca cac ccc acc tct gac aag gaa	764		
Phe Phe Lys Cys Gly Ala His Pro Thr Ser Asp Lys Glu			
210	215	220	
aca cca gla gct ttg cac ctg atc gca aca aat agt cgg	803		
Thr Pro Val Ala Leu His Leu Ile Ala Thr Asn Ser Arg			
225	230		
aac atc act tgc att acg tgc aca gac glc agg agc ccc	842		
Asn Ile Thr Cys Ile Thr Cys Thr Asp Val Arg Ser Pro			
235	240	245	
gtc ctg gtt ttc cag tgc aac tcc cgc cac glg att tgc	881		
Val Leu Val Phe Gln Cys Asn Ser Arg His Val Ile Cys			
250	255	260	
tta gac tgt ttc cac tta tac tgt gtg aca aga ctg aat	920		
Leu Asp Cys Phe His Leu Tyr Cys Val Thr Arg Leu Asn			
265	270		
gal cgg cag ttt gtt cac gac cct caa ctt ggc tac tcc	959		
Asp Arg Gln Phe Val His Asp Pro Gln Leu Gly Tyr Ser			
275	280	285	
ctg cct tgt gtg gct ggc tgt ccc aac tcc ttg att aaa	998		
Leu Pro Cys Val Ala Gly Cys Pro Asn Ser Leu Ile Lys			
290	295		

gag ctc cat cac ttc agg att ctg gga gaa gag cag tac 1037
 Glu Leu His His Phe Arg Ile Leu Gly Glu Glu Gln Tyr
 300 305 310
 aac cgg tac cag cag tat ggt gca gag gag tgt gtc ctg 1076
 Asn Arg Tyr Gln Gln Tyr Gly Ala Glu Glu Cys Val Leu
 315 320 325
 cag atg ggg ggc gtg tta tgc ccc cgc cct ggc tgt gga 1115
 Gln Met Gly Gly Val Leu Cys Pro Arg Pro Gly Cys Gly
 330 335
 gcg ggg ctg ctg ccg gag cct gac cag agg aaa gtc acc 1154
 Ala Gly Leu Leu Pro Glu Pro Asp Gln Arg Lys Val Thr
 340 345 350
 tgc gaa ggg ggc aat ggc ctg ggc tgt ggg ttt gcc ttc 1193
 Cys Glu Gly Gly Asn Gly Leu Gly Cys Gly Phe Ala Phe
 355 360
 tgc cgg gaa tgt aaa gaa gcg tac cat gaa ggg gag tgc 1232
 Cys Arg Glu Cys Lys Glu Ala Tyr His Glu Gly Glu Cys
 365 370 375
 agt gcc gta ttt gaa gcc tca gga aca act act cag gcc 1271
 Ser Ala Val Phe Glu Ala Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ala
 380 385 390
 tac aga gtc gat gaa aga gcc gcc gag cag gct cgt tgg 1310
 Tyr Arg Val Asp Glu Arg Ala Ala Glu Gln Ala Arg Trp
 395 400
 gaa gca gcc tcc aaa gaa acc atc aag aaa acc acc aag 1349
 Glu Ala Ala Ser Lys Glu Thr Ile Lys Lys Thr Thr Lys
 405 410 415
 ccc tgt ccc cgc tgc cat gta cca gtg gaa aaa aat gga 1388

Pro Cys Pro Arg Cys His Val Pro Val Glu Lys Asn Gly
 420 425
 ggc tgc atg cac atg aag tgt ccg cag ccc cag tgc agg 1427
 Gly Cys Met His Met Lys Cys Pro Gln Pro Gln Cys Arg
 430 435 440
 ctg gag tgg tgc tgg aac tgt ggc tgc gag tgg aac cgc 1466
 Leu Glu Trp Cys Trp Asn Cys Gly Cys Glu Trp Asn Arg
 445 450 455
 gtc tgc atg ggg gac cac tgg ttc gac gtg tagccagggc 1506
 Val Cys Met Gly Asp His Trp Phe Asp Val
 460 465
 ggccggggcgc cccatcgcca catccigggg gagcatacc agtgtctacc 1556
 ttcatcttct aattctcttt tcaaacacac acacacacgc gcgcgcgcgc 1606
 acacacactc ttcaagtttt ttcaaagtc caactacagc caaatlgcag 1656
 aagaaactcc tggatccctt tcactatgtc catgaaaaac agcagagtaa 1706
 aattacagaa gaagctcctg aatcccttcc agttgtgcca cacaagacag 1756
 cagagccatc tgcgacacca ccaacaggcg ttctcagcct ccggaatgaca 1806
 caaataccag agcacagatt caagtgcaat ccatgtatct gtaatgggtca 1856
 ttctcaccctg aattcgagac aggcagaatc agtagctgga gagagagttc 1906
 tcacatttaa tatcctgcct ttaccctca gtaaacacca lgaagatgcc 1956
 atlgacaagg tgtttctctg taaaatgaac tgcagtggtt tctccaaact 2006
 agattcatgg cttaacagt aatgttctta tttaaatttt cagaaagcat 2056
 ctattcccaa agaaccaccag gcaatagtca aaaacatttg ttatctctta 2106
 agaattccat ctatataaat cgcatataac gaaataccaa ctatgtgtaa 2156
 atcaacttgt cacaaagtg gaaatataa aagttaatll gaatgttgaa 2206
 tgtttgaatt acagggaaga aatcaagtta atgtacttcc attcccttcc 2256
 atgatttgca actllagaaa gaaattgttt ttctgaaagt atcaccacaaa 2306
 aatctatagt ttgattctga gtattcatll tgcaacttgg agattttgct 2356

aalacatttg gclccactgt aaalllaata gataaagtc clataaagga 2406
aacacgltta gaaalgattl caaaalgata licaatclla acaaaagtga 2456
acattattaa atcagaatcl ttaaagagga gccittccag aactaccaa 2506
atgaagacac gcccgactcl cccaalcaga aggglttata ccccttggc 2556
acaccclclc lglccaatcl gcaaglccta gggagclclg calaccagg 2606
gtlccccagg agagacccll clttaggaca glaaactcac tagaatallc 2656
cltalgtlga calggattgg atttcagtlc aatcaaactl lcagctllll 2706
tltcagccat lcacaacaca atcaaaagat laacaacaci gcatgcggca 2756
aaccgcalgc cltlaccac actacgcaga agagaaagta caaccactat 2806
cltllgtlcl accglattlg cltgactlcl caggaagalc glgaacataa 2856
clgagggcalt gatlclclcl agcacaigga ggcccllllg gatttagaga 2906
clgtaaalla tlaaatcggc aacagggccl clctlltttag atgtagcact 2956
gaaa 2960

<210> 2

<211> 2876

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> 102..1412

<221> exon 1

<222> 1..108

<221> exon 2

<222> 109..272

<221> exon 3

<222> 273..513

<221> exon 4
 <222> 514..635
 <221> exon 6
 <222> 636..751
 <221> exon 7
 <222> 752..888
 <221> exon 8
 <222> 889..950
 <221> exon 9
 <222> 951..1100
 <221> exon 10
 <222> 1101..1184
 <221> exon 11
 <222> 1185..1302
 <221> exon 12
 <222> 1303..2876

<400> 2

```

tccgggagga ttaccagga gaccgciggt gggaggcgcg gctggcgccg 50
ctgcgcgcgt gggcctgttc ctggcccgca gccgccacct acccagigac 100
c atg ala gtg ttt gtc agg ttc aac tcc agc cat ggt ttc 140
Met Ile Val Phe Val Arg Phe Asn Ser Ser His Gly Phe
      1              5              10
cca gtg gag gtc gat tct gac acc agc atc ttc cag ctc 179
Pro Val Glu Val Asp Ser Asp Thr Ser Ile Phe Gln Leu
      15              20              25
aag gag gtg gtt gct aag cga cag ggg gtt ccg gct gac 218
Lys Glu Val Val Ala Lys Arg Gln Gly Val Pro Ala Asp
  
```

30	35	
cag ttg cgt gtg att ttc gca ggg aag gag ctg agg aat		257
Gln Leu Arg Val Ile Phe Ala Gly Lys Glu Leu Arg Asn		
40	45	50
gac tgg act gtg cag aat tgt gac ctg gat cag cag agc		296
Asp Trp Thr Val Gln Asn Cys Asp Leu Asp Gln Gln Ser		
55	60	65
att gtt cac att gtg cag aga ccg tgg aga aaa ggt caa		335
Ile Val His Ile Val Gln Arg Pro Trp Arg Lys Gly Gln		
70	75	
gaa atg aat gca act gga ggc gac gac ccc aga aac gcg		374
Glu Met Asn Ala Thr Gly Gly Asp Asp Pro Arg Asn Ala		
80	85	90
gcg gga ggc tgt gag cgg gag ccc cag agc ttg act cgg		413
Ala Gly Gly Cys Glu Arg Glu Pro Gln Ser Leu Thr Arg		
95	100	
gtg gac ctc agc agc tca gtc ctc cca gga gac tct gtg		452
Val Asp Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Gly Asp Ser Val		
105	110	115
ggg ctg gct gtc att ctg cac act gac agc agg aag gac		491
Gly Leu Ala Val Ile Leu His Thr Asp Ser Arg Lys Asp		
120	125	130
tca cca cca gct gga agt cca gca ggt aga tca atc tac		530
Ser Pro Pro Ala Gly Ser Pro Ala Gly Arg Ser Ile Tyr		
135	140	
aac agc ttt tat gtg tat tgc aaa ggc ccc tgt caa aga		569
Asn Ser Phe Tyr Val Tyr Cys Lys Gly Pro Cys Gln Arg		
145	150	155

gtg cag ccg gga aaa ctc agg gla cag tgc agc acc tgc	608	
Val Gln Pro Gly Lys Leu Arg Val Gln Cys Ser Thr Cys		
160	165	
agg cag gca acg ctc acc ttg acc cag gaa ttt ttc ttt	647	
Arg Gln Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Glu Phe Phe Phe		
170	175	180
aaa tgt gga gca cac ccc acc tct gac aag gaa aca cca	686	
Lys Cys Gly Ala His Pro Thr Ser Asp Lys Glu Thr Pro		
185	190	195
gla gct ttg cac ctg atc gca aca aat agt cgg aac atc	725	
Val Ala Leu His Leu Ile Ala Thr Asn Ser Arg Asn Ile		
200	205	
act tgc att acg tgc aca gac gtc agg agc ccc gtc ctg	764	
Thr Cys Ile Thr Cys Thr Asp Val Arg Ser Pro Val Leu		
210	215	220
gtt ttc cag tgc aac tcc cgc cac gtg att tgc tta gac	803	
Val Phe Gln Cys Asn Ser Arg His Val Ile Cys Leu Asp		
225	230	
tgt ttc cac tta tac tgt gtg aca aga ctc aat gat cgg	842	
Cys Phe His Leu Tyr Cys Val Thr Arg Leu Asn Asp Arg		
235	240	245
cag ttt gtt cac gac cct caa ctt ggc tac tcc ctg cct	881	
Gln Phe Val His Asp Pro Gln Leu Gly Tyr Ser Leu Pro		
250	255	260
tgt gtg gct ggc tgt ccc aac tcc ttg att aaa gag ctc	920	
Cys Val Ala Gly Cys Pro Asn Ser Leu Ile Lys Glu Leu		
265	270	
cat cac ttc agg att ctg gga gaa gag cag tac aac cgg	959	

His His Phe Arg Ile Leu Gly Glu Glu Gln Tyr Asn Arg
 275 280 285
 tac cag cag tat ggt gca gag gag tgt glc ctg cag atg 998
 Tyr Gln Gln Tyr Gly Ala Glu Glu Cys Val Leu Gln Met
 290 295
 ggg ggc gtg tta tgc ccc cgc cct ggc tgt gga gcg ggg 1037
 Gly Gly Val Leu Cys Pro Arg Pro Gly Cys Gly Ala Gly
 300 305 310
 ctg ctg ccg gag cct gac cag agg aaa glc acc tgc gaa 1076
 Leu Leu Pro Glu Pro Asp Gln Arg Lys Val Thr Cys Glu
 315 320 325
 ggg ggc aat ggc ctg ggc tgt ggg ttt gcc ttc tgc cgg 1115
 Gly Gly Asn Gly Leu Gly Cys Gly Phe Ala Phe Cys Arg
 330 335
 gaa tgt aaa gaa gcg tac cat gaa ggg gag tgc agt gcc 1154
 Glu Cys Lys Glu Ala Tyr His Glu Gly Glu Cys Ser Ala
 340 345 350
 gta ttt gaa gcc tca gga aca act act cag gcc tac aga 1193
 Val Phe Glu Ala Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ala Tyr Arg
 355 360
 gtc gat gaa aga gcc gcc gag cag gct cgt tgg gaa gca 1232
 Val Asp Glu Arg Ala Ala Glu Gln Ala Arg Trp Glu Ala
 365 370 375
 gcc tcc aaa gaa acc atc aag aaa acc acc aag ccc tgt 1271
 Ala Ser Lys Glu Thr Ile Lys Lys Thr Thr Lys Pro Cys
 380 385 390
 ccc cgc tgc cat gla cca gtg gaa aaa aat gga ggc tgc 1310
 Pro Arg Cys His Val Pro Val Glu Lys Asn Gly Gly Cys

395

400

atg cac atg aag tgt ccg cag ccc cag tgc agg ctc gag 1349
Met His Met Lys Cys Pro Gln Pro Gln Cys Arg Leu Glu

405

410

415

tgg tgc tgg aac tgt ggc tgc gag tgg aac cgc gtc tgc 1388
Trp Cys Trp Asn Cys Gly Cys Glu Trp Asn Arg Val Cys

420

425

atg ggg gac cac tgg ttc gac gtc TAGCCAGGGC GGCCGGGCGC 1432
Met Gly Asp His Trp Phe Asp Val

430

435

cccatcgcca catcctgggg gagcataccc agtgtctacc ttcatititct 1482
aatctctitl tcaaacacac acacacacgc gcgcgcgcgc acacacactc 1532
ttcaagtitt ttcaaagtc caactacagc caaatigcag aagaaactcc 1582
tggatccctt tcaatgttc catgaaaaac agcagagtaa aattacagaa 1632
gaagctccig aatccctttc agtttgtcca cacaagacag cagagccatc 1682
tgcgacacca ccaacaggcg ttctcagcct ccggaigaca caaataccag 1732
agcacagatt caagtgcaat ccatgtatct gtaigggica ttctcaccig 1782
aatcagagac aggcagaatc agtagctgga gagagagtic tcacatitaa 1832
tatcctgctt ttacattca glaaacacca lgaagatgcc attgacaagg 1882
tgtttctctg taaaatgaac tgcagtgggt tctccaaaci agattcatgg 1932
ctttaacagt aatgttctta tttaaatitt cagaaagcat ctatcccaa 1982
agaaccccag gcaatagica aaaacatttg ttlatcctta agaattccat 2032
ctatataaat cgcatataac gaaatacca ctatgtglaa atcaacttgt 2082
cacaagtga gaaattatga aagttaattt gaatgttgaa tgtttgaatt 2132
acagggaaga aatcaagtta atgtactttc attccctttc atgatttgca 2182
actttagaaa gaaattgttt ttctgaaagt atcaccaaaa aatctatagt 2232
ttgattctga gtattcatit tgcacttgg agattttgt aatacatttg 2282
gtccacatgt aaatttaata gataaagtc ctataaagga aacacgttta 2332

gaaaatgattt caaaaatgata ttcaatctta acaaaaagtag acattatata 2382
 atcagaatcti ttaaagagga gcccttccag aactaccaa aigaagacac 2432
 gcccgactcti ctccatcaga agggtttata ccccttggc acacccctc 2482
 lgtccaatcti gcaagtccca gggagctctg calaccaggg gtccccagg 2532
 agagaccttc tcttaggaca gtaaactcac tagaataatc cttaatgta 2582
 catggattgg aatlcagttc aatcaaacti tcagcttttt tttagccat 2632
 tcacaacaca atcaaaaagat taacaacact gcatgcggca aaccgcatgc 2682
 tcttaccac actacgcaga agagaaagta caaccactat ctttgttct 2732
 acctgtattg tctgacttct caggaagatc gtgaacataa ctgagggc 2782
 gagctcact agcacaatga ggcccttttg gatttagaga ctgtaaaata 2832
 ttaaatcggc aacagggtt ctttttttag atgtagcact gaaa 2876

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 3

gtacgtgggt

10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 4

ccttgggtcag

10

<210> 5

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 5

gtgagtcctcc

10

<210> 6

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 6

tcccaaacag

10

<210> 7

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 7

gtaattggaa

10

<210> 8

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 8

tcttctccag

10

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 9

gtaaggaaat

10

<210> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 10

tttcccaaag

10

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 11

gtaagtlacct

10

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 12

tttcttttcag

10

<210> 13

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 13

gtaaggatct

10

<210> 14

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 14

ctctctgcag

10

<210> 15

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 15

gtaagtctag

10

<210> 16

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 16

tttccaacag

10

<210> 17

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 17

gtgagtgagc

10

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 18

ggtttttgcag

10

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 19

gtgagtactg

10

<210> 20

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 20

tcttttgcag

10

<210> 21

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 21

gtacagaatg

10

<210> 22

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 22

gtttccccag

10

<210> 23

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 23

gtgagtcctgt

10

<210> 24

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> 1..10

<400> 24

cccccaacag

10

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

gcgcggcctgg cgccgcctgcg cgca

24

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

catgtcggag agacgcggcg

20

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgttgctat caccatttaa ggg

23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

gtacggcgga cgcgacgggtt aga

23

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

acaatgtcact ttgtcttccc t

21

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

cgtcagacgt accctgtacc gga

23

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

aggtagatca atctacaaca gct

23

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cgtccgttgc gagtggaact gggtc

25

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

acaagctttt aaagagtttc ttgt

24

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

acacatgatt gigtacgga

20

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

acatgictta aggaglacat tt

22

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gtgacaaacg gtcctttaat ctct

24

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

agagattggt tactgtggaa aca

23

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

tcctagattt ttatcgtagt gag

23

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

gagccccgtc ctggttttcc

20

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

aaccgatgag ggacggaaca cacc

24

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

tgcttttcca cactgacagg tact

24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

agagattacg attacttctt gtct

24

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

tgatagtcatt aactgtgtgt aag

23

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

ttctatctgc gattactctg tca

23

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

gggtgaaatt tgcagtcagt

20

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

acgtgtaccc gaccctaata laa

23

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

attgccaaat gcaacctaat gtc

23

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

ttacgggaig agtaaggagg tt

22

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

acagggaaca taaacictga tcc

23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

agacttccac ggaccacaca ac

22

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

gtttgggaat gcgtgtttt

19

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

acagatggaa glaaaagatt aaga

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18 // A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOBIB (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Tohru Kitada et al., "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism", NATURE (9 April 1998), Vol. 392, No. 6676, p.605-608	1-42
A	Hiroto Matsumine et al., "Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27", American Journal of Human Genetics (1997), Vol. 60, No. 3, p.588-596	1-42
A	Masaaki Saito et al., "Refinement of the gene locus for autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) on chromosome 6q25.2-27", American Journal of Human Genetics (1997), Vol. 61, No. 4 suppl., p.A293, 1708	1-42
A	S. Shimoda-Matsubayashi et al., "Mn SOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control", Neurology (1997), Vol. 49, No. 5, p.1257-1262	1-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 April, 1999 (28. 04. 99)Date of mailing of the international search report
18 May, 1999 (18. 05. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/00545

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 15/12, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K14/47, C07K16/18 // A61K 38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 15/12, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K 38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOBIB (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Tohru Kitada et al. "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism", NATURE (9 April 1998), Vol. 392, No. 6676, p. 605-608	1-42
A	Hiroto Matsumine et al. "Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27", American Journal of Human Genetics (1997), Vol. 60, No. 3, p. 588-596	1-42

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
口若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.04.99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N 9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Masaaki Saito et al. "Refinement of the gene locus for autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) on chromosome 6q25.2-27", American Journal of Human Genetics (1997), Vol. 61, No. 4 suppl., p. A293, 1708	1-42
A	S. Shimoda-Matsubayashi et al. "Mn SOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control", Neurology (1997), Vol. 49, No. 5, p. 1257-1262	1-42